ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. III No 4

1 9 5 4

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
12 FEB 1955

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, Al. Racławickie 20.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, fancuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania; c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam, gdzie to możliwe, powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w dwukrotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nru rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na pismiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18,.) lub (Cienkowski 18,.). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887a. 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i incjały autora(ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma: w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M-molarny, N-normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu „stężenie % — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich.

W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują *Acta* bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 28.— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja Acta Mikrobiol. Polon., Lublin, Al. Racławickie 20).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. III No 4

1954
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Lublin, Eugeniusz Pijanowski — członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Kazimierz Dygdała

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE WARSZAWA — 1954

Nakład 1113+25 odb.	*Oddano do składania 12.VIII.54*
Ark. wyd. 4,6 Ark. druk. $3^{10}/_{16}$	*Podpisano do druku 10.XII.54*
Papier bezdrz. III kl. 80g. 70×100	*Druk. ukończono 12.XII.54*
Cena zł 10.—	*Zamówienie 1052c/54 5-B-30955*

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

Acta Microbiologica Polonica Vol. III, No 4

W. Ostrowski, B. Skarżyński i *T. W. Szczepkowski*

BIOCHEMIA SAMOŻYWNYCH BAKTERII SIARKOWYCH, CZĘŚĆ II WITAMINY GRUPY B U *THIOBACILLUS THIOPARUS* I *THIOBACILLUS THIOOXYDANS*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie
Wpłynęło dn. 8.II.1954 r.

Przełomowym momentem w kształtowaniu się pojęcia witaminów były badania nad rolą i znaczeniem w życiu drobnoustrojów substancji, których witaminowy charakter stwierdzony został na podstawie doświadczeń na wyższych zwierzętach. Okazało się, że liczne witaminy są egzogennymi substancjami chemicznymi, niezbędnymi również do życia wszystkim drobnoustrojom; stwierdzono także, że wiele drobnoustrojów rozwija się dobrze bez dopływu tych czynników chemicznych z zewnątrz. W świecie bakterii klasyczne pojęcie witaminów straciło więc pierwotne swoje znaczenie. Niemniej jednak okazało się, że wszystkie dotychczas badane drobnoustroje cudzożywne potrzebują pewnych witaminów, takich samych, jakich potrzebują do normalnego metabolizmu komórki zwierzęce i roślinne. Różnica pomiędzy poszczególnymi gatunkami drobnoustrojów polega tylko na tym, że albo wymagają dopływu tych substancji z zewnątrz, albo też potrafią je endogennie wytwarzać. Odnosi się to do wszystkich witaminów, które traktowane były w nauce jako człony zespołu witaminów B. Na tej podstawie sformułował W i l l i a m s i współpracownicy (1950) definicję witaminów B, zaliczając do nich wszystkie egzogenne organiczne biokatalizatory ustroju zwierzęcego, które są niezbędne do prawidłowego toku procesów życiowych na wszystkich szczeblach rozwoju świata żyjącego.

Wychodząc z tych założeń musimy odmiennie traktować cyjanokobalaminę, obdarzoną powszechnie nazwą witaminu B_{12}, gdyż substancja ta, niezbędna dla wszystkich ustrojów cudzożywnych, jest zbyteczna dla samożywnych roślin zielonych.

W tych ogólnobiologicznych rozważaniach istnieje jednak pewna luka, którą stanowią samożywne drobnoustroje pozbawione chlorofilu. Jeżeli klasyczne witaminy B miałyby być biokatalizatorami o powszechnym znaczeniu w całej ożywionej przyrodzie, należałoby się spodziewać, że samożywne bakterie powinny zawierać te same substancje, wytwarzając je endogennie. Zupełnie odrębna pozycja, jaką zajmują te drobnoustroje w poglądach na ewolucję świata żyjącego, wyraża się w przypisywaniu tym organizmom bądź to najpierwotniejszego charakteru, bądź to bardzo wysokiego stopnia ewolucyjnego. Okoliczność ta jak również niezwykłe, wyjątkowe rysy metabolizmu tych bakterii uzasadniają wątpliwość, czy istotnie witaminy B mają dla tych organizmów takie samo znaczenie jak dla reszty

świata ożywionego. Dotychczas tylko raz próbowano podejść do tego zagadnienia na drodze doświadczalnej. O'Kane (1942) badał zawartość tiaminy, ryboflawiny, biotyny, pirydoksyny i kwasu pantotenowego w komórkach *Th. thiooxydans*, dochodząc do wniosku, że wszystkie te witaminy zawarte są w komórkach tego drobnoustroju jako produkt endogennej syntezy. Bardzo krótkie doniesienie tego autora o jego badaniach nie zawiera żadnych danych o sposobie przeprowadzenia doświadczeń. Treść tego doniesienia nasuwa raczej przypuszczenie, że O'Kane doszedł do takich wniosków na tej podstawie, że żaden z wymienionych witaminów B nie wzmagał wzrostu *Th. thiooxydans*, rosnącego na pożywce złożonej wyłącznie z nieorganicznych substancji.

W toku naszych badań nad metabolizmem samożywnych bakterii siarkowych podjęliśmy powyżej sformułowane zagadnienie, oznaczając ilościowo metodami mikrobiologicznymi poszczególne składniki zespołu witaminów B w hodowlach zarówno *Th. thiooxydans*, jak i *Th. thioparus*. Wychodziliśmy z założenia, że ważne będzie rozstrzygnięcie nie tylko pytania, czy samożywne bakterie siarkowe produkują witaminy B, lecz również czy zawartość ich w komórkach tych drobnoustrojów leży w tym samym rzędzie wielkości, w jakim wyraża się zawartość witaminów B w komórkach drobnoustrojów cudzożywnych. Poza tym oznaczyliśmy ilościowo kodehydrogenazę I jako najcharakterystyczniejszy koenzym, w skład którego wchodzi niacyna.

Wreszcie przeprowadziliśmy badania zawartości cyjanokobalaminy, zaliczanej powszechnie do witaminów B, a to właśnie z uwagi na fakt, że biokatalizator ten jest zbędny dla wszystkich samożywnych ustrojów zielonych.

METODYKA

Oba typy samożywnych bakterii, poddawanych badaniu na zawartość poszczególnych witaminów, były hodowane na syntetycznych pożywkach w sposób przedstawiony już poprzednio (Szczepkowski i Skarżyński, 1952). Hodowle odsączano na sączku porcelanowym i poddawano wirowaniu w celu oddzielenia komórek bakteryjnych od siarki. Dalszy sposób traktowania bakterii w celu poddania ich analizie na zawartość poszczególnych witaminów będzie omówiony poniżej.

Wszystkie witaminy oznaczano metodami mikrobiologicznymi, posługując się odpowiednimi szczepami drobnoustrojów lub pleśni (*L. casei, L. arabinosus, Phycomyces blakesleanus, Euglena gracilis*). Sposób postępowania zgodny był zasadniczo z wytycznymi opracowanymi w podstawowych publikacjach (Roberts i Snell 1946, Barton-Wright 1946, Teply i Elvehjem 1945, Schopfer 1935, 1945) z zastosowaniem modyfikacji wprowadzonych w naszej pracowni, a podanych w łączności ze szczegółami technicznymi, omówionymi poniżej. Dokładny opis stosowanej przez nas techniki mikrobiologicznego oznaczania witaminów został podany przez Ostrowskiego (1954).

1. OZNACZANIE RYBOFLAWINY

Posługiwaliśmy się szczepem *Lactobacillus casei*, rozwijającym się na syntetycznej pożywce wg Robertsa i Snella (1946). Czas inkubacji wynosił 72 godziny w temperaturze 37°. Wzrost bakterii oznaczano potencjometrycznym miareczkowaniem wytworzonego kwasu mlekowego.

Około 3 g odwirowanych komórek *Th. thioparus* lub *Th. thiooxydans*

przemywano 3-krotnie roztworem NaCl i po zadaniu 50 ml 0,1 N HCl (W e g n e r i współpracownicy, 1942) autoklawowano przez 30 minut pod ciśnieniem 1 atmosfery. Po ochłodzeniu doprowadzano pH roztworu do 4,5 dodając 10 N NaOH, przesączano, doprowadzano pH do 6,8 i wyciągano dwukrotnie eterem. Tak przygotowany hydrolizat przechowywano w ciemności, biorąc do badania 1—5 ml.

2. OZNACZANIE KWASU NIKOTYNOWEGO

Posługiwano się szczepem *Lactobacillus arabinosus*, rozwijającym się na pożywce R o b e r t s a i S n e l l a (1946). Warunki inkubacji i pomiar przeprowadzano w ten sam sposób, jak przy oznaczaniu ryboflawiny. Badany materiał bakteryjny, przemyty 0,9% NaCl, autoklawowano w temperaturze 121° przez 1 godzinę z dodatkiem 50 ml 1 N HCl (K r e h l i współpracownicy, 1946). Po ochłodzeniu doprowadzano pH do 4,5 i po odsączeniu osadu doprowadzano pH do 6,8. Do badania używano 1—5 ml klarownego roztworu.

3. OZNACZANIE BIOTYNY

Posługiwano się szczepem *L. arabinosus*; pożywka i sposób postępowania takie, jak przy oznaczaniu ryboflawiny i niacyny. Badane bakterie autoklawowano w 10-krotnej objętości 6 N H_2SO_4 pod ciśnieniem 1 atmosfery w ciągu 1 godziny. Produkt autoklawowany zobojętniano nasyconym roztworem Ba $(OH)_2$ i po odwirowaniu osadu używano 1 ml odpowiednio rozcieńczonego roztworu do badań.

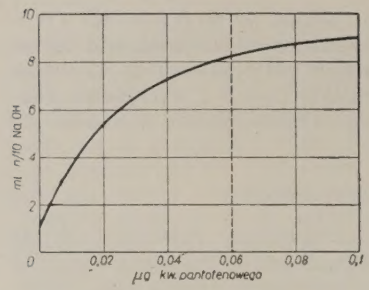
4. OZNACZANIE KWASU PANTOTENOWEGO

Posługiwano się *L. arabinosus*, używając pożywki B a r t o n - W r i g h t (1946) zmodyfikowanej w ten sposób, że zamiast fotolizowanego peptonu dodawano pepton oczyszczony perhydrolem (Z b a r s k i i współpracownicy, 1949). W pożywce pominięto dodatek ksylozy, ksantyny i ryboflawiny, a za-

T a b e l a I

Sposób postępowania dla oznaczania kwasu pantotenowego
Метод обозначания пантотеновой кислоты
The method for the determination of pantothenic acid

Składniki	Próbka zerowa	Próbka kontrolna	Próbka pełna
Zawiesina komórek bakterii	—	1 ml	1 ml
Roztwór enzymu wątrobowego w 0,02 M $NaHCO_3$	0,05 ml	—	0,05 „
Roztwór zasad. fosfatazy	0,2 „	—	0,2 „
w 0,1 M $NaHCO_3$	0,05 „	—	0,05 „
Woda	1,7 „	1 ml	0,7 „



Rys. 1. Wpływ stężenia kwasu pantotenowego na wzrost *L. arabinosus*. Krzywa wzorcowa

Рис. 1. Влияние концентрации пантотеновой кислоты на рост *L. arabinosus*. Образцовая кривая.

Fig. 1. The influence of the concentration of pantothenic acid on the growth of *L. arabinosus* (standard curve)

miast kazeinu hydrolizowanego kwasem dodawano równoważną ilość kazeinu trawionego trypsyną i oczyszczanego węglem. Inkubacja trwała 72 godziny w temperaturze 30°. Wzrost oznaczano potencjometrycznym miareczkowaniem.

W celu wydzielenia kwasu pantotenowego z jego połączenia (koenzym A) zawiesinę badanych bakterii zadawano roztworem enzymu uzyskanego z wątroby kurczęcia oraz roztworem zasadowej fosfatazy uzyskanej z jelita cielęcego (Schmidt i Thannhauser, 1946, Neilands i Strong, 1948). Schemat postępowania, mającego na celu oznaczanie kwasu pantotenowego, podaje tab. I.

Zawartość probówek inkubowano w termostacie w temperaturze 37° w ciągu 4 godzin, następnie rozcieńczano 10-krotnie wodą, odwirowywano i do badania brano 1 — 5 ml klarownego roztworu. Zawartość kwasu pantotenowego w badanym roztworze określano przez porównanie z krzywą wzorcową, przedstawioną na rys. 1.

5. OZNACZANIE KWASU PTEROILOGLUTAMINOWEGO

Używano *L. casei* oraz pożywki Teply i Elwehjem (1945), zmodyfikowanej w ten sposób, że zamiast kazeinu hydrolizowanego kwasem solnym używano kazeinu trawionego trypsyną i oczyszczanego węglem. Pepton stosowany w pożywce oczyszczano perhydrolem. Czas inkubacji wynosił 72 godziny w temperaturze 37°; wzrost oznaczano potencjometrycznym miareczkowaniem.

Zawiesinę badanych bakterii, przemytych roztworem soli fizjologicznej, zadano 5 ml buforu octanowego o pH = 4,5 i dodawano 0,3 g suszonej koniugazy (Bird i współpracownicy, 1945). Po dopełnieniu wodą do 10 ml dodawano kilka kropli toluenu i trzymano w temperaturze 37° w ciągu 48 godzin. Po upływie tego czasu autoklawowano przez 5 minut w temperaturze 100°, roztwór doprowadzano do pH 6,8, rozcieńczano w kolbce miarowej wodą do objętości 50 ml i przesączano przez gęsty sączek. Przesącz odpowiednio rozcieńczano i do badania brano 1 ml klarownego roztworu.

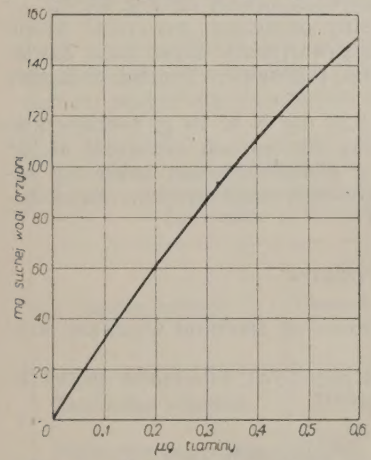
6. OZNACZANIE TIAMINY

Posługiwano się pleśnią *Phycomyces blakesleanus*. Do 25 ml syntetycznej pożywki wg Schopfera (1935) zmodyfikowanej przez Hammera (1943) dodawano badaną próbkę, autoklawowano i szczepiono odpowiednio przygotowaną zawiesiną zarodników pleśni. Inkubacja trwała 14 dni i przebiegała w temperaturze pokojowej. Po ukończeniu inkubacji zbierano grzybnię, suszono w suszarce do stałej wagi i ważono. Zawartość tiaminy

w badanych preparatach określano przez porównanie z krzywą wzorcową uzyskaną przez hodowanie pleśni na pożywkach z dodatkiem zmiennej ilości tiaminy. Krzywa wzorcowa tiaminy przedstawiona jest na rys. 2. Komórki bakteryjne przygotowywano do badania w ten sposób, że ich zawiesinę w roztworze NaCl kolejno zamrażano w ciekłym powietrzu i ogrzewano do 50°. Czynność tę powtarzano 50 razy. Odsączano osad i do badań używano 0,1—5 ml roztworu.

7. OZNACZANIE CYJANOKOBALAMINY

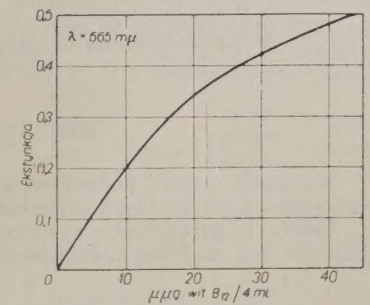
Stosowano glon *Euglena gracilis v. bacillaris*, rozwijający się na pożywce wg Hutnera i współpracowników (1948), zmodyfikowanej przez Rossa (1950). Inkubowano przez 7 dni w fototermostacie w temperaturze 30°, po czym odwirowywano komórki glonów i ekstrahowano chlorofil metanolem. Zawartość chlorofilu w wyciągu oznaczano mierząc ekstynkcję dla światła o długości fali 665 milimikronów za pomocą spektrofotometru fotoelektrycznego. Uzyskane w ten sposób wartości porównywano z krzywą wzorcową, przygotowaną w identycznych warunkach przy użyciu krystalicznego witaminu B_{12}, przedstawioną na rys. 3. Dokładny opis zastosowanego w tym wypadku sposobu postępowania podany został przez Ostrowskiego, Skarżyńskiego i Żaka (1954).



Rys. 2. Wpływ stężenia tiaminy na wzrost *Ph. blakesleanus*

Рис. 2. Влияние концентрации тиамина на рост *Ph. blakesleanus*.

Fig. 2. The influence of the concentration of thiamin on the growth of *Ph. blakesleanus*



Rys. 3. Wpływ stężenia witaminu B_{12} na wzrost *E. gracilis var. bacillaris*

Рис. 3. Влияние концентрации витамина B_{12} на рост *E. gracilis var. bacillaris*

Fig. 3. The influence of the concentration of vitamin B_{12} on the growth of *E. gracilis v. bacillaris*

8. OZNACZANIE KODEHYDROGENAZY I

Stosowano metodę podaną przez Sumnera Krishnana (1948), opartą na szybkości odbarwiania błękitu metylenowego w układzie: kwas mlekowy, apodehydrogenaza kwasu mlekowego, diaforaza i kodehydrogenaza

I w obecności HCN. Szybkość redukcji błękitu metylenowego zależy od ilości dodanej kodehydrogenazy, o ile pozostałe składniki układu znajdują się w nadmiarze. Pomiary wykonywano w rurkach Thunberga w atmosferze azotu w temperaturze 25°. Wzorcowy preparat kodehydrogenazy I o 65% czystości uzyskano metodą Jandorfa (1941).

9. OBLICZANIE ILOŚCI CZĄSTECZEK WITAMINÓW PRZYPADAJĄCYCH NA 1 KOMÓRKĘ BAKTERYJNĄ

Z dokładnie przemytej hodowli bakterii sporządzono zawiesinę w izotonicznym roztworze NaCl i za pomocą dokładnie wycechowanej na mikrowadze pętli platynowej przenoszono na szkiełko podstawowe znaną ilość odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny bakteryjnej mieszając z roztworem barwika (cyjanochiny). Pod szkiełko podłożony był papier z zaznaczonym kwadratem o boku 1 cm. Mieszaninę zawiesiny bakterii z roztworem barwika rozprowadzano na szkiełku po powierzchni 1 cm^2, po czym obliczono ilość bakterii w rzędzie poziomym i pionowym, albo po wyznaczeniu pola widzenia mikroskopu za pomocą mikroskali obliczono na podstawie kilkudziesięciu pomiarów średnią ilość bakterii, przypadającą na daną powierzchnię. Obie metody liczenia komórek bakteryjnych dawały zgodne wyniki.

W odmierzonej osobnej próbce zawiesiny oznaczono zawartość azotu. Wartość ta, podzielona przez ilość bakterii zawartych w danej ilości zawiesiny, wyrażała ilość azotu przypadającą na 1 komórkę. Poniżej podajemy przykład postępowania.

Zawiesinę *Th. thioparus*, zawierającą 1,26 mg N w 10 g, rozcieńczano 50-krotnie. W 2 mg rozcieńczonej zawiesiny stwierdzono zawartość 34.10^4 komórek bakteryjnych, to znaczy, że 10 g nierozcieńczonej zawiesiny zawierało $34.10^4 \times 50 \times 5000 = 85 \times 10^9$ komórek bakteryjnych. Na 1 komórkę przypada więc $0{,}15 \times 10^{-10}$ mg N.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

Wszystkie poniżej podane wartości cyfrowe są średnimi wynikami uzyskiwanymi z trzykrotnych oznaczeń.

Tabela II przedstawia zawartość poszczególnych witaminów grupy B, przypadającą na 1 mg bakteryjnego azotu.

Tabela II

Zawartość witaminów grupy B na 1 mg bakteryjnego azotu
Количество витаминов группы В на 1 мг бактерийного азота
The quantities of biocatalysers from vitamin-B group per 1 mg of bacterial N

Szczep bakterii	μg / mg N			mμg / mg N			μμg/mgN
	Tiamina	Ryboflawina	Kwas nikotynowy	Biotyna	Kwas pteroiloglutaminowy	Kwas pantotenowy	Witamin B_{12}
Thiobacillus thioparus	0,21	0,31	0,92	7,69	4,65	2,50	276,00
Thiobacillus thiooxydans	0,23	0,60	0,15	6,44	18,90	570,00	124,50

Z wartości podanych w tej tabeli wyraźnie uwydatnia się różnica w ilości poszczególnych witaminów, występujących w 2 różnych gatunkach bakterii siarkowych.

Tabela III podaje zawartość witaminów w 1 ml pożywki, w której rozwijały się odnośne bakterie siarkowe.

Tabela III

Zawartość witaminów w pożywkach

Количество витаминов в питательных средах

The vitamins content of cultures medium

Szczep bakterii	μg/ml pożywki		mμg/ml pożywki			μμg/ml pożywki
	Ryboflawina	Kwas nikotynowy	Biotyna	Kwas pteroiloglutaminowy	Kwas pantotenowy	Witamin B_{12}
Thiobacillus thioparus	0,0037	0	0,0175	4,80	0	0
Thiobacillus thiooxydans	0,012	0,055	0,0095	1,00	0,40	0

Z powyższych danych wynika, że oba badane gatunki bakterii siarkowych zupełnie nie wydzielają do pożywki cyjanokobalaminy i niacyny. Natomiast wydzielają stosunkowo pokaźne ilości kwasu PG i biotyny.

Tabela IV

Ilość cząsteczek witaminów przypadająca na jedną komórkę bakteryjną

Количество молекулов витаминов, приходящихся на одну бактериальную клетку

The number of molecules of vitamins per one bacterial cell

Szczep bakterii	Tiamina	Ryboflawina	Kwas nikotynowy	Biotyna	Kwas pteroiloglutaminowy	Kwas pantotenowy
Thiobacillus thioparus	7100	7400	68100	280	90	100
Thiobacillus thiooxydans	11400	18800	16200	350	560	34500
Inne bakterie	1900 - 5400	7200 - 11000	96000 - 120000	420 - 1800	180 - 1200	24000 - 96000

Tabela IV podaje ilość cząsteczek poszczególnych witaminów, przypadającą na 1 komórkę bakteryjną. Dla porównania podano odnośne cyfry dotyczące innych gatunków bakterii wg Mc Ilwaina (1946).

Tabela V obrazuje wyniki ilościowego oznaczania kodehydrogenazy I w bakteriach siarkowych.

Z podanych w tabeli V wartości wynika, że *Th. thiooxydans* zawiera o wiele mniej kodehydrogenazy niż *Th. thioparus*, co pokrywa się z wynikami mikrobiologicznego oznaczania niacyny w komórkach tych bakterii.

Tabela V

Zawartość kodehydrogenazy I na 1 mg bakteryjnego azotu

Количество кодегидрогеназы I на 1 мг бактерийного азота.

The codehydrogenase I content per 1 mg of bacterial N

Szczep bakterii	mg N/ ml zawiesiny	ml zawiesiny	Czas odbarwiania	Kozymaza µg	Kozymaza µg/1mg
Thiobacillus thioparus	0,81	2	1,45	2,5	1,5
	0,81	1,5	2,30	2,0	1,6
	0,81	1	6,00	1,0	1,2
Thiobacillus thiooxydans	2,5	2	5,00	1,25	0,25
	2,5	1,5	—	—	ślad

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nasze nad występowaniem biokatalizatorów typu witaminów B w obu typach samożywnych bakterii siarkowych doprowadzają do wniosku, że autotrofy te pod tym względem nie różnią się zasadniczo od organizmów heterotroficznych. Zawierają one tiaminę, ryboflawinę, niacynę, biotynę, kwas pantotenowy i kwas pteroiloglutaminowy, przy czym część zawartej niacyny występuje w postaci tego samego połączenia, w jakiej występuje niacyna we wszystkich żywych ustrojach, to znaczy w postaci dwunukleotydu dwufosfopirydynowego. Natomiast z badań naszych wynika znamienna różnica między samożywnymi bakteriami siarkowymi a światem autotrofów zielonych. Zarówno *Th. thiooxydans*, jak i *Th. thioparus* zawierają witamin B_{12}, czyli cyjanokobalaminę, a więc biokatalizator, którego obecności w roślinach zielonych dotychczas nigdy nie stwierdzono.

O ile z jakościowego punktu widzenia zawartość witaminów B w komórkach samożywnych bakterii siarkowych odpowiada temu, co wiemy o składzie chemicznym drobnoustrojów cudzożywnych, to ilościowe wyniki naszych badań wskazują na pewne znamienne różnice, zaznaczające się zresztą w różny sposób w obu typach bakterii. Różnice te występują szczególnie wyraźnie, gdy porównamy nasze wyniki ilościowe z wynikami analiz typowych bakterii cudzożywnych podanych w tabeli VI, zestawionych na podstawie monografii Williamsa i współpracowników (1950) i referatu van Lanena i Tannera (1948).

W cyfrach podanych w tabeli VI uderza niewielka zawartość niacyny, szczególnie mała w przypadku *Th. thiooxydans*. Oba typy bakterii zawierają również stosunkowo niewiele biotyny, a dla *Th. thioparus* charakterystyczna jest znikoma zawartość kwasu pantotenowego. *Th. thiooxydans* zawiera ten biokatalizator w ilościach znacznie większych, w każdym jednak razie ilości te leżą w rzędzie wielkości niższym niż ten, który odpowiada zawartości kwasu pantotenowego w drobnoustrojach cudzożywnych.

Te wybitne różnice w rozmieszczeniu witaminów pozostają niewątpliwie w związku z odrębnością metabolizmu drobnoustrojów siarkowych. Poprzednio wykazaliśmy, że *Th. thioparus* zawiera stosunkowo niewiele oksydazy cy-

Tabela VI

Zawartość witaminów w jednym gramie suchej masy bakterii w mikrogramach
Количество витаминов в одном грамме сухой массы бактерий, в микрограммах
The micrograms of vitamins contained in one gram of bacterial dry weight

	Tiamina	Ryboflawina	Kwas nikotynowy	Biotyna	Kwas P. G.	Kwaspantotenowy
Th. thioparus	21	31	92	0,77	0,46	0,75
Th. thiooxydans	23	60	15	0,64	1,89	57
Aerobacter aerogenes	11—15	43	240-200	2,4-3,9	1,0-3,9	140-340
Azotobacter chroococcum	33—96		590			
Propionibacterium pentosaceum	0,4—6,2					93
Clostridium butylicum	9,3	55	250	1,7	0,5	92
Proteus vulgaris	21		250	3,4	4,2	100
Pseudomonas fluorescens	26	68	210	7,1	1,8	90
Serratia marcescens	27	35	240	4,1	3,2	120
Bacillus pasteurianum		15				

tochromowej i tylko jeden z cytochromów — cytochrom *c*, a *Th. thiooxydans* nie zawiera w ogóle układu cytochromowego (Szczepkowski i Skarżyński, 1952). Prawdopodobnie w łączności z tym faktem pozostaje mała ilość niacyny i kodehydrogenazy w komórkach *Th. thioparus*, a znikoma ilość tych związków w komórkach *Th. thiooxydans*. Przypuszczalnie również duża zawartość ryboflawiny w komórkach *Th. thiooxydans* wiąże się z tym odrębnym zestawem biokatalizatorów, biorących udział w procesach oksydoredukcyjnych.

Nie jesteśmy w stanie wytłumaczyć, od czego zależy znikoma zawartość kwasu pantotenowego w *Th. thioparus*. Nieprawdopodobny jest błąd doświadczalny, gdyż zgodne wyniki uzyskano z analizy 3 różnych hodowli tego drobnoustroju przy postępowaniu, które w przypadku innych gatunków drobnoustrojów dawało przeszło 100 razy wyższe wartości. Centralna rola kwasu pantotenowego jako składnika koenzymu A w metabolizmie komórkowym czyni niklą zawartość tego biokatalizatora w komórkach *Th. thioparus* szczególnie interesującym problemem.

Autotrofizm drobnoustrojów pozbawionych chlorofilu jest sprawą przedstawiającą liczne biochemiczne aspekty, nie poruszane dotychczas na drodze doświadczeń. Dokładniejsze przebadanie rozmieszczenia poszczególnych biokatalizatorów w komórkach tych bakterii może stanowić jeden ze sposobów podejścia do rozwiązania tego trudnego problemu, jakim jest metabolizm bezchlorofilowych samożywnych organizmów.

Poczuwamy się do miłego obowiązku wyrażenia wdzięczności asystentce naszego Zakładu, lek. Zdyb-Gumińskiej, za przeprowadzenie oznaczeń tiaminy oraz prof. Janickiemu w Poznaniu za użyczenie szczepu *Euglena gracilis*.

В. Островски, Б. Скаржински и Т. В. Щепковски

БИОХИМИЯ АВТОТРОФНЫХ СЕРОБАКТЕРИЙ. ЧАСТЬ II. ВИТАМИНЫ ГРУППЫ „В" у *THIOBACILLUS THIOPARUS* и *THIOBACILLUS THIOOXYDANS*

Резюме

При помощи микробиологических методов определяния витаминов, авторами было установлено, что в клетках обоих подвергнутых исследованию видов автотрофных серобактерий выступают следующие витамины группы В: тиамин, рибофлавин, ниацин, биотин, пантотеновая и птероилглютаминовая кислоты. Количество витаминов обозначено в микрограммах на 1 мг бактерийного азота и на 1 г сухой массы. Авторами было определено среднее количество молекулов отдельных витаминов на одну бактерийную клетку (Табл. II, III, IV и V).

Автотрофные серобактерии качественным составом витаминов В не отличаются от гетеротрофных бактерий, но выступают большие разницы в количественном отношении. Автотрофные серобактерии содержат гораздо меньше биотина и ниацина (особенно *Th. thiooxydans*) (Табл. VI). Заслуживает внимания ничтожное количество пантотеновой кислоты в клетках *Th. thioparus*, в то время как количество этого соединения у *Th. thiooxydans* почти такое как у гетеротрофных бактерий.

Часть ниацина у обоих рассматриваемых серобактерий выступает в виде *DNP*. Количество упомянутой субстанции точно определено (Табл. V).

Обе исследуемые серобактерии содержат витамин B_{12}. В этом отношении эти автотрофные бактерии резко отличаются от зеленых растений, в которых этот фактор, как правило, не выступает.

W. Ostrowski, B. Skarżyński and *T. W. Szczepkowski*

THE BIOCHEMISTRY OF AUTOTROPHIC SULPHUR BACTERIA. PART II. THE BIOCATALYSERS FROM THE VITAMIN-B GROUP IN *TH. THIOPARUS* AND *TH. THIOOXYDANS*

Summary

Using microbiological methods, it was shown that the cells of both types of autotrophic sulphur bacteria contain the following biocatalysers from the vitamin-B group: thiamin, riboflavin, niacin, biotin, pantothenic acid and pteroylglutham ic acid. The quantities of these substances have been expressed in micrograms per mg of bacterial nitrogen and per g dry weight. The average number of molecules of particular vitamins contained in one bacterial cell has been calculated (Table II, III, IV and V).

The two types of autotrophic bacteria examined do not differ qualitatively from the heterotrophic microorganisms in regard to their content of vitamin B. Nevertheless some notable quantitative differences occur: both types of autotrophic bacteria contain, in comparison with the heterotrophic microorganisms (Table VI), notably less biotin and niacin (especially *Th. thiooxydans*). The very small amount of pantothenic acid in *Th. thioparus* is characteristic; in *Th. thiooxydans* this compound was found in amounts which are com-

parable with those contained in the heterotrophic microorganisms.

The niacin occurs in both types of sulphur bacteria partly as DNP. The content of this compound in both types of bacteria was investigated quantitatively (Table V).

Both types of sulphur bacteria tested quantitatively contain vitamin B_{12}. The autotrophic sulphur bacteria differ distinctly from the autotrophic green organisms in their content of this biocatalyst.

LITERATURA

1. Barton-Wright E. G., 1946: Practical methods for the microbiological assay of the vitamin B complex and essential amino acids, *Ashe Laboratories,* Ltd. London.
2. Bird C. D., Binkley S. B., Bloom E. S., Emmet A. D. a. Pfiffner J. J., 1945: On the enzymic formation of vitamin B_c from its conjugate, *J. biol. Chem.,* **157** : 413.
3. Hammer, Steward, a. Matron., 1943: Thiamine determination, *Food Res.* **8** : 444.
4. Hutner S. H., Prowasoli L., Stokstod L. A., Hofman C. E., Beht M., Franklin A. L., a. Jukes T. H., 1948: Assay of anti-pernicious anemia factor with *Euglena, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **70** : 118.
5. Jandorf B. J., 1941: A method for the isolation of diphosphopyridine nucleotide, *J. Biol. Chem.,* **138** : 305.
6. Krehl W. A., de la Huerga J., Elvehjem C. A. a. Hart E. B., 1946: The distribution of niacinamid and niacin in natural materials, *J. Biol. Chem.,* **166** : 53.
7. Mc Ilwain. 1946: The magnitude of microbial reactions involving vitaminlike compounds. *Nature,* **158** : 898.
8. Neilands J. B. a. Strong F. M., 1948: The enzymatic liberation of pantothenic acid, *Arch. Biochem.,* **19** : 287.
9. O'Kane D. J., 1942: The presence of growth factors in the cells of the autotrophic sulphur bacteria, *J. Bact.,* **42** : 7.
10. Ostrowski W., 1954: Zastosowanie metod mikrobiologicznych w analizie biochemicznej, *Acta Microbiol. Polon.,* **3** : 35.
11. Ostrowski W., Skarżyński B. i Żak Z., 1954: Rozmieszczenie witaminu B_{12} wśród białek surowicy. *Acta Biochimica* **1** : 13.
12. Roberts E. C. a. Snell E. E., 1946: An improved medium for microbiological assay with *Lactobacillus casei, J. Biol. Chem.,* **163** : 499.
13. Ross G. I. M., 1950: Vitamin B_{12} assay in body fluids, *Nature,* **166** : 270.
14. Schmidt G. a. Thanhauser S. J., 1946: Intestinal phosphatase, *J. Biol. Chem.,* **149** : 369.
15. Schopfer W. H., 1935: Recherches sur l'emploi possible d'un test végetal pour la vitamine B_1, *Bull. Soc. Chim. Biol.,* **17** : 1097.
16. Schopfer W. H., 1945: Les test microbiologiques pour la determination des vitamines, *Experientia,* **1** : 183.
17. Sumner J. B. a. Krishnan P. S., 1948: The estimation of coenzyme I using apodehydrogenases, *Enzymologia,* **12** : 232.
18. Szczepkowski T. W. i Skarżyński B., 1952: Biochemia bakterii siarkowych. Cz. I. Układ cytochromowy i hemoproteidy *Thiobacillus thiopurus* i *Thiobacillus thiooxydans, Acta Microbiol. Polon.,* **1** : 93.
19. Tepley L. J. a. Elvehjem C. A., 1945: The titrimetric determination of *Lactobacillus casei* factor and „Folic acid", *J. Biol. Chem.,* **157** : 303.

20. Van Lanen J. M. a. Tanner F. W., 1948: Vitamins in Microorganism, *Vitamins and Hormones,* **6** : 164.
21. Wegner M. J., Kemmerer A. R. a. Fraps E. S., 1942: Influence of the method of preparation of sample on microbiological assay for riboflavin, *J, Biol. Chem.,* **146** : 547.
22. Wiliams R. J., Eakin R. E., Beerstecher E. a. Shive W., 1950: The Biochemistry of B Vitamins, Reinhold Publ. Corp. New York.
23. Zbarski B. J., Mardaszek S. R. i Słucki N. J., 1949: Mikrobiologiczeskoje opriedielenje aminokisłot, *Woprosy medic. chimii* **1** : 18.

Acta Microbiologica Polonica Vol. III, No 4

R. Pakuła, M. Tyc i *Wł. Walczak*

BAKTERIOLIZYNY PROMIENIOWCÓW
I. OTRZYMYWANIE BAKTERIOLIZYN, ZASIĘG ORAZ WARUNKI DZIAŁANIA

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Wpłynęło dnia 1.VI.1954 r.

Liczne szczepy promieniowców z rodzaju *Streptomyces* wykazują zdolność rozpuszczania martwych bakterii gramdodatnich oraz gramujemnych, a także niektórych żywych bakterii gramdodatnich. Bakteriolizę powodują zarówno same promieniowce, jak i jałowe przesącze ich hodowli. Zjawisko to opisał L i e s k e (1921). Niezależnie od tego badacza podobne obserwacje poczynili G r a t i a i D a t h (1924, 1925 a, b, 1926). Przesącze bakteriolitycznych hodowli autorzy ci nazwali mykolizatami oraz stwierdzili, iż zawarty w przesączach czynnik aktywny ma własności antygenowe. Badania G r a t i i (1934) miały między innymi na celu wykorzystanie mykolizatów w terapii niektórych schorzeń zakaźnych.

W e l s c h (1941, 1942, 1947 a, 1947 b, 1948) badał przez dłuższy okres warunki powstawania bakteriolizyn oraz mechanizm ich działania. Badania jego potwierdziły obserwacje L i e s k e g o nad zdolnością niektórych promieniowców do rozpuszczania martwych bakterii gramujemnych oraz żywych paciorkowców, dwoinek zapalenia płuc i gronkowców. Żywe bakterie gramujemne okazały się zupełnie niewrażliwe zarówno na działanie rosnących promieniowców, jak i jałowych przesączów hodowli, nazwanych przez W e l s c h a aktynomycetyną. W e l s c h przez 75% nasycenie przesączów siarczanem amonowym otrzymał czynnik lityczny w stanie skoncentrowanym i wykazał jego złożoną naturę. Zdaniem W e l s c h a wyciągi eterowe aktynomycetyny zawierają substancję o charakterze lipoidu, zabijającą niektóre bakterie gramdodatnie. Natomiast w substancjach wytrąconych za pomocą siarczanu amonowego obecny jest system proteolityczny, działający nie tylko na białka martwych bakterii, ale także na różne białka niebakteryjnego pochodzenia.

J o n e s, S w a l l o w i W e b b (1948) również wykazali w aktynomycetynie obecność czynnika bakteriobójczego. System proteolityczny, jak wynika z ich badań, jest natury złożonej, w skład jego bowiem wchodzą proteinazy, peptydazy i rybonukleazy.

M c C a r t y (1952) wykorzystał bakteriolizyny wytwarzane przez szczep *Streptomyces albus* do badań nad budową antygenową paciorkow-

ców hemolizujących grupy A. Badacz ten nie wykrył rybonukleazy w przesączach hodowli badanych przez siebie szczepów promieniowców.

Studiując piśmiennictwo omawianego przedmiotu stwierdza się poważne różnice między wynikami otrzymanymi przez poszczególnych autorów. Różnice te dotyczą nie tylko objaśnienia mechanizmu działania aktynomycetyny, ale również sposobu jej otrzymania. Na przykład Jones, Swallow i Webb hodowali promieniowce w bulionie i stwierdzili, iż aktywność przesączu pojawia się nie wcześniej niż w 15 dniu wzrostu. Mc Carty zaś używając podłoża półsyntetycznego, zawierającego hydrolizat kazeiny jako źródło azotu, otrzymał maksymalną wydajność bakteriolizyn już po 2—3 dniach wzrostu.

Z powyższych faktów można wysnuć wniosek, iż przyczyną tak odmiennych wyników jest prawdopodobnie — obok stosowania różnych podłóż — także posługiwanie się różnymi szczepami.

Maxted (1948) wykazał, iż lizatów paciorkowców hemolizujących, rozpuszczonych przez aktywne przesącze szczepu *Streptomyces albus*, można użyć jako roztworu wielocukru w odczynie precypitacji, którym się posługujemy przy różnicowaniu tych drobnoustrojów na grupy serologiczne (Lancefield 1933). Praca Maxteda zwróciła naszą uwagę na bakteriolizyny wytwarzane przez promieniowce, ponieważ zdawało się rzeczą możliwą wykorzystanie ich w badaniach nad budową antygenową bakterii, a zwłaszcza w badaniach nad wielocukrami bakteryjnymi. Bakteriolizyny są bowiem bardzo łagodnym czynnikiem rozbijającym komórki, umożliwiającym przejście wielocukrów do roztworu w mało zmienionej postaci. Zastosowanie tej metody ekstrakcji wielocukrów z komórki umożliwiło jednemu z autorów niniejszej pracy wykazanie niejednorodności somatycznych wielocukrów paciorkowców hemolizujących (Pakuła, 1952). W tym celu należało zbadać zdolność wytwarzania bakteriolizyn przez większą ilość szczepów promieniowców i ustalić optymalne warunki wytwarzania oraz działania lizyn.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy. Przebadano aktywność bakteriolityczną 18 szczepów promieniowców. Z nich 10 należało do gatunku *Streptomyces griseus*, 1 — *Streptomyces albus*, 1 — *Streptomyces venezuelae*, 1 — *Streptomyces aureus*; przynależność gatunkowa 5 pozostałych nie została określona. Wszystkich szczepów (za wyjątkiem szczepu *Streptomyces albus*, który pochodzi z pracowni Maxteda w Londynie) użyczył nam laskawie doc. Kuryłowicz, za co mu wyrażamy podziękowanie.

Aktywność bakteriolityczną hodowli promieniowców badano na różnych — bądź muzealnych, bądź izolowanych z bieżącego materiału — szczepach gronkowców, paciorkowców, pałeczek duru brzusznego, okrężnicy, laseczki siennej i innych bakterii.

Podłoża. Przebadano szereg podłóż agarowych i płynnych w celu stwierdzenia, w którym z nich promieniowce z rodzaju *Streptomyces* wytwarzają najaktywniejsze bakteriolizyny. Promieniowce hodowano w podłożach bulionowych z dodatkiem różnych gatunków peptonów oraz w niżej wymienionych podłożach nie zawierających wyciągu mięsnego:

A		B	
wody wodoc.	— 1000 ml	wody wodoc.	— 1000 ml
peptonu Proteose	5 g	peptonu Proteose	5 g
wyciągu Fildes	25 ml	glukozy	10 g
glukozy	2 — 10 g	Bewitu	3 g
Bewitu	3 g	Na_2HPO_4	2 g
Na_2HPO_4	2 g	agaru	12,5 g
agaru	12,5 g		

C		D	
wody wodoc.	— 1000 ml	wody wodoc.	— 1000 ml
asparaginy	0,5 g	Casitone	5 g
glukozy	10 g	glukozy	5 g
K_2HPO_4	0,5 g	NaCl	5 g
agaru	12,5 g	K_2HPO_4	2 g
		$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 g
		$CaCl_2$	0,04 g
		$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02 g
		$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
		agaru	12,5 g

Szczepy promieniowców hodowano przede wszystkim na stałych podłożach w litrowych butelkach Roux, do których nalewano 100 - 110 ml podłoża (warstwa agaru grubości około 3 mm). Na podłoże to posiewano 2 — 3 ml zawiesiny zarodników w wodzie destylowanej.

Znaczną wydajność bakteriolizyn otrzymywano w zależności od rodzaju użytego podłoża oraz temperatury hodowli po 2 — 5 dniach. Po tym okresie zamrażano podłoże w butlach, pozostawiając je przez noc w temperaturze — 10° — 30°. Następnego dnia pozwalano, by podłoże odtajało w temperaturze pokojowej. W czasie tajania z podłoża zostawał wyciśnięty klarowny płyn, zawierający czynnik lityczny. Płyn sączono najpierw przez bibuły, a następnie przez filtr Berkefelda. W tym stanie z dodatkiem 0,5% fenolu można czynnik lityczny przechować w temperaturze 2° — 4° przez wiele miesięcy bez utraty aktywności.

Czynnik lityczny otrzymano również w płynnych hodowlach przewietrzanych na trzęsawce.

STĘŻENIE I OCZYSZCZANIE CZYNNIKA LITYCZNEGO

Stosowano metodę Mc Carty'ego wytrącania aktywnej substancji z roztworu przez 70% nasycenie siarczanem amonowym. Siarczan amonowy *in substantia* dodawano do przesączów otrzymanych ze stałych podłoż sposobem zamrażania i odtajania. Następnego dnia po usunięciu płynu rozpuszczano powstały precypitat w M 15 buforze fosforanowym. Na każdy litr pierwotnego przesączu dodawano 20 — 30 ml buforu.

Roztwór w buforze fosforanowym dializowano wobec wody destylowanej aż do zaniku jonów SO_4''.

METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI BAKTERIOLITYCZNEJ

Orientacyjnie oznaczano aktywność lityczną badanych szczepów promieniowców na stałych podłożach w sposób następujący: do 13 ml rozpuszczonego podłoża agarowego dodawano taką ilość zawiesiny zabitych w temperaturze 60° pałeczek okrężnicy lub duru

brzusznego, by końcowe stężenie komórek w 1 ml podłoża wynosiło 2000 milionów. Po dokładnym zmieszaniu wylewano zawartość probówki do płytki Petriego, a następnie w środku płytki, w kole o średnicy około 1 cm, wysiewano zarodnik badanego szczepu promieniowca. Aktywność lityczną mierzono szerokością pasa, w którym martwe bakterie uległy rozpuszczeniu

Dokładniej oznaczano aktywność przesączów hodowli lub stężonych preparatów bakteriolizyn turbidymetrycznie w fotokolorymetrze Kletta — Sommersona, mierząc spadek zmętnienia zawiesiny zawierającej znaną ilość komórek bakteryjnych.

WYNIKI

PRZYDATNOŚĆ POSZCZEGÓLNYCH PODŁÓŻ DLA PRODUKCJI BAKTERIOLIZYN

Wyciąg mięsny z dodatkiem różnych gatunków peptonów okazał się do produkcji bakteriolizyn zupełnie nieprzydatny. Promieniowce rosły na tym podłożu wolno, a przesącze hodowli, badane w ciągu okresu 15-dniowego, nie wykazywały aktywności litycznej.

Zmienne wydajności bakteriolizyn otrzymywano na podłożu *A* zalecanym przez Maxteda. Wyciąg Fildesa okazał się w naszych badaniach nie tylko czynnikiem zbędnym, ale prawdopodobnie czasami nawet hamującym wytwarzanie bakteriolizyn. Niestałość wyników, być może, była powodowana niejednolitością poszczególnych porcji wyciągów Fildesa.

Przez usunięcie z podłoża *A* (Maxteda) wyciągu Fildesa oraz po zastąpieniu angielskiego produktu „Yeastral" krajowym „Bewitem" sporządzono podłoże *B*, na którym dość regularnie otrzymywano dobrą wydajność bakteriolizyn.

Na podożu *C* wydajność bakteriolizyn była nieznaczna, jednakże dodatek 0,2- -0,3% dializatu autolizowanych drożdży powodował znaczny wzrost aktywności. Dobre i powtarzalne wyniki otrzymywano z podłożem *D* Mc Carty'ego, w którym hydrolizat kazeiny „Casamino" zastąpiono podobnym hydrolizatem „Casitone". Aktywne szczepy promieniowców wytwarzały na tym podłożu w 37° optymalne ilości bakteriolizyn już po 48—72 godzinach. Podłoże *D* okazało się zatem najodpowiedniejsze i tylko z niego korzystano w dalszych etapach pracy.

Na podłożu *D* wytwarzanie bakteriolizyn zachodzi szybciej niż na podłożu *C*.

Powyższe uwagi dotyczą podłóż stałych. W nie przewietrzanych podłożach płynnych, w których głębokość warstwy płynu nie przekraczała 5 mm, nie stwierdzono wytwarzania bakteriolizyn. Obecność bakteriolizyn stwierdzono jednakże w płynnych hodowlach, przewietrzanych na trzęsawce.

AKTYWNOŚĆ BAKTERIOLITYCZNA POSZCZEGÓLNYCH SZCZEPÓW

Na podstawie wstępnych badań stwierdzono, iż z 18 badanych szczepów promieniowców aktywność bakteriolityczną wykazywało jedynie 5. Pozostałych 13 bądź wcale nie rozpuszczało bakterii, bądź aktywność ich była nieznaczna.

Czas niezbędny do całkowitego rozpuszczenia 2000 milionów komórek żywych paciorkowców hemolizujących, zawieszonych w 1 ml przesączu hodowli wyżej wymienionych 5 szczepów promieniowców, przedstawia tab. I.

Podobne wyniki otrzymano określając aktywność bakteriolityczną szczepów promieniowców na podłożu agarowym, zawierającym martwe pałeczki okrężnicy.

Najbardziej aktywny okazał się w obu metodach szczep nr 15. W dalszej pracy przedmiotem badań były tylko bakteriolizyny wytwarzane przez ten szczep.

WPŁYW TEMPERATURY HODOWLI NA WYTWARZANIE BAKTERIOLIZYN

Badano przesącze hodowli agarowych (podłoże *D*) wyrosłych w temperaturze 30° i 37°. W obu przypadkach czynne szczepy promieniowców wytwarzały bakteriolizyny. W temperaturach poniżej 30° otrzymano wydajność gorszą niż w 30° i 37° i to niezależnie od czasu trwania hodowli. Temperatury 30° i 37° są tak samo odpowiednie, jednakże przetrzymanie hodowli w wyższej temperaturze powoduje szybszy spadek aktywności niż w temperaturze niższej.

Ilustruje to tab. II, gdzie podano czas niezbędny do uzyskania całkowitej lizy określonej ilości martwych komórek paciorkowców.

Tabela I

Czasy niezbędny do całkowitego rozpuszczenia $2 \cdot 10^9$ żywych komórek paciorkowca hemolizującego przez 1 ml przesączu hodowli *Streptomyces*

Время необходимое для полного растворения 2.10^9 живых клеток гемолизирующих стрептококков одним мл фильтрата культуры *Streptomyces*

The time of the total lysis of 2.10^9 living cells of haemolytic streptococci by 1 ml of the *Streptomyces* culture-filtrate.

Nr szczepu	Czas lizy w minutach
1	47
3	54
9	63
11	35
15	25

Tabela II

Wpływ temperatury hodowli promieniowca na wytwarzanie bakteriolizyn

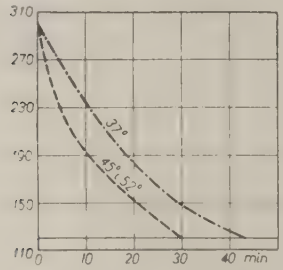
Влияние температуры культуры актиномицетов на образование бактериолизин.

The effect of the temperature of the incubation upon the bacteriolysine-production by *Streptomyces*.

Szczep	Temperatura hodowli	Wiek hodowli w godzinach	Ilość komórek martwych paciorkowców w 1 ml przesączu	Czas trwania bakteriolizy w minutach
15	30°	48	około $\cdot 10^9$	55
	37°			35
	30°	72		39
	37°			36
	30°	144		60
	37°			130

WPŁYW TEMPERATURY NA SZYBKOŚĆ BAKTERIOLIZY

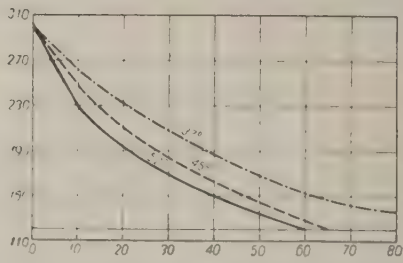
Załączone krzywe ilustrują szybkość przebiegu bakteriolizy zawiesiny martwych oraz żywych paciorkowców hemolizujących grupy A w temperaturach 37°, 45° i 52° (na 1 ml płynu aktywnego przypadało około 10^9 komórek).



Rys. 1. Wpływ temperatury na szybkość bakteriolizy martwych paciorkowców

Рис. 1. Влияние температуры на быстроту бактериолиза мертвых стрептококков.

Fig. 1. The effect of the temperature on the velocity of bacteriolysis of dead streptococci.



Rys. 2 Wpływ temperatury na szybkość bakteriolizy żywych paciorkowców

Рис. 2. Влияние температуры на быстроту бактериолиза живых стрептококков

Fig. 2. The effect of the temperature on the velocity of bacteriolysis of living streptococci

Pomiarów dokonywano w odstępach 10-minutowych w fotokolorymetrze. Krzywe te wskazują, iż zarówno liza żywych, jak i martwych bakterii przebiega wolniej w temperaturze 37° niż w wyższych temperaturach. W temperaturze 45° szybkość lizy martwych bakterii jest taka sama, jak w 52°. Nieco szybszy przebieg lizy żywych paciorkowców w 52° niż w 45° jest prawdopodobnie powodowany tym, iż w temperaturze 45—52° część komórek ulega zabiciu, co oczywiście wpływa na szybkość lizy.

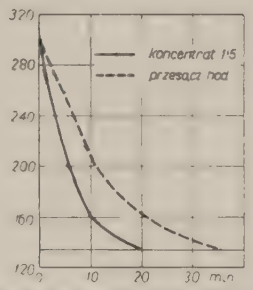
ZASIĘG DZIAŁANIA BAKTERIOLIZYN

Jałowe przesącze hodowli promieniowca nr 15 rozpuszczają martwe bakterie gramujemne i gramdodatnie. Stwierdzono działanie lityczne na następujące drobnoustroje: pałeczki okrężnicy, pałeczki z rodzajów *Salmonella, Shigella, Proteus,* ziarenkowce gramujemne, paciorkowce hemolizujące i zieleniejące, dwoinki zapalenia płuc, gronkowce oraz laseczniki sienne. Z wymienionych wyżej drobnoustrojów w stanie żywym lizie ulegają tylko ziarenkowce gramdodatnie — i to paciorkowce szybciej niż gronkowce.

STĘŻONE ROZTWORY BAKTERIOLIZYN

Jak już wspomniano wyżej, bakteriolizyny obecne w przesączach hodowli promieniowców wytrącają się pod wpływem $(NH_4)_2SO_4$. Wytrącony osad po rozpuszczeniu w buforze fosforanowym i po dializie wobec wody de-

stylowanej wykazuje znacznie większą aktywność bakteriolityczną w stosunku do żywych paciorkowców oraz innych martwych drobnoustrojów niż pierwotny przesącz. Z 1 litra pierwotnego przesączu otrzymywano zwykle po dializie około 40 ml koncentratu. Aktywność tego roztworu po 5-krotnym rozcieńczeniu w wodzie destylowanej w zestawieniu z aktywnością lityczną pierwotnego przesączu przedstawiają rys. 3 i 4.



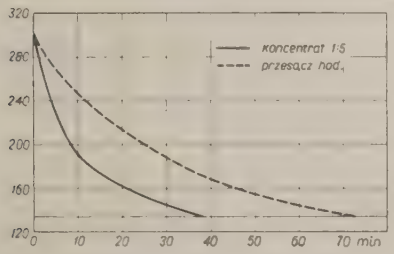
Rys. 3. Aktywność lityczna koncentratu i przesączu hodowli w stosunku do martwych paciorkowców. ———— koncentrat (1,5) — — — przesącz hodowli

Рис. 3. Литическая активность концентратов и фильтрата культуры по отношению к мертвым стрептококкам

концентрат (1,5) ————

фильтрат культуры - - - -

Fig. 3. Lytic action of the filtrate and the concentrated filtrate of the culture-fluid on the dead streptococci. Filtrate - - - -; concentrated filtrate (1,5) ————



Rys. 4. Aktywność lityczna koncentratu i przesączu hodowli w stosunku do żywych paciorkowców. ————koncentrat (1 : 5) — — —przesącz hodowli

Рис. 4. Литическая активность концентрата и фильтрата культуры по отношению к живым стрептококкам концентрат (1,5), ———— фильтрат культуры. — — — — — —

Fig. 4. Lytic action of the filtrate and the concentrated filtrate of the culture-fluid on the living streptococci. concentrated filtrate (1,5) ————, filtrate — — — —

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nasze — jakkolwiek przeprowadzone nad niewielką ilością szczepów — wykazały, iż zdolność wytwarzania bakteriolizyn u promieniowców z rodzaju *Streptomyces* nie jest zjawiskiem rzadkim. Aktywność bakteriolityczna poszczególnych szczepów jest różna.

Najlepszą wydajność bakteriolizyn 5 wybranych szczepów otrzymano na podłożach nie zawierających wyciągu mięsnego i pepionu, przy czym podłoże odpowiednie dla jednego szczepu było również odpowiednie dla pozostałych. Również działanie na różne bakterie bakteriolizyn wspomnianych 5 szczepów było takie same. Z obu tych faktów można wysnuć wniosek, iż bakteriolizyny wytwarzane przez różne szczepy są do siebie podobne. Należy pamiętać jednak, iż szczep badany przez Jonesa i współpracowników (1948) w przeciwieństwie do naszych szczepów wytwarzał bakteriolizyny w bulionie. Zatem wniosek o identyczności bakteriolizyn wytwarzanych przez wszystkie szczepy promieniowców nie byłby zupełnie uzasadniony.

Podłoże *D* okazało się najlepsze dla produkcji bakteriolizyn. Na tym podłożu nasze szczepy promieniowców wytwarzają szybko i w dużych ilościach bakteriolizyny, a nadto podłoże to nie zawiera substancji wielkocząsteczkowych, co umożliwia otrzymanie względnie czystych koncentratów aktywnej substancji przez wytrącanie jej siarczanem amonowym.

Podobnie jak i inni autorzy, stwierdziliśmy, że obecność soli znacznie obniża aktywność bakteriolizyn, dlatego też otrzymane koncentraty rozcieńczaliśmy w wodzie destylowanej. Fakt, iż bakterioliza zarówno żywych, jak i martwych bakterii zachodzi szybciej w temperaturze 45° lub 52° niż w 37°, wskazuje, iż optimum temperatury dla aktywności litycznej leży powyżej 37°.

P. Пакула, М. Тыц и В. Вальчак

БАКТЕРИОЛИЗИНЫ У АКТИНОМИЦЕТОВ. I. ПОЛУЧАНИЕ БАКТЕРИОЛИЗИНОВ, ПРЕДЕЛ И УСЛОВИЯ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Резюме

Из числа 18-ти исследованных штаммов из рода *Streptomyces* 5 продуцировало бактериолизины, растворяющие мертвые грам-отрицательные и грамположительные бактерии, а также некоторые живые грамположительные бактерии. Оптимальная продуктивность бактериолизинов была получена на полусинтетической среде, содержащей гидролизат казеина, глюкозу и минеральные соли (Мэк Карти).

Процесс образования бактериолизинов протекает одинаково хорошо как при температуре 30°, так и при 37°, при последней однако — быстрее. Процесс растворяния живых стрептококков протекает медленнее, чем мертвых. В границах температур 45 — 52° активность энзима самая оптимальная. Концентраты литического фактора, полученные путем прибавления к фильтрату сернокислого амония, проявляют гораздо большую активность, чем исходный фильтрат.

R. Pakuła, M. Tyc and *W. Walczak*

THE BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*. I. PRODUCTION OF BACTERIOLYSIN AND CONDITIONS OF ITS ACTIVITY

Summary

The bacteriolytic activity of 18 strains of *Streptomyces* was studied. Among them 5 caused lysis of dead gram-positive and gram-negative bacteria and of some living gram-positive bacteria. The best yield of bacteriolysin was observed in a semi-synthetic medium containing a casein hydrolysate as nitrogen source.

Active strains of *Streptomyces* produced bacteriolysin at 30° as well as at 37°, but at 37° at a higher rate. The lysis of living bacteria was slower than of dead ones. Crude concentrates of the lytic factor produced by addition of ammonium sulfate to the filtrate, followed by dialysis of the dissolved sediment, wer more active than the original filtrate.

LITERATURA

1. Gratia A. et Dath S., 1924: L' action bacteriolytique de streptothrix. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **91** : 1442; 1925a-**92** : 640; 1925b-**93** : 451; 1926-**94**; 1267.
2. Gratia A., 1934: La dissolution des bactéries et ses applications thérapeutiqes, *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.*, 285.
3. Jones A. S., Swallow A. J. a. Webb M., 1948: The exocellular bacteriolytic system of soil actinomyces, *Biochim. Biophys. Acta*, **2**:167.
4. Lancefield R. C., 1933: A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci, *J. Exp. Med.*, **71**:571.
5. Lieske R., 1921: Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Leipzig, 138.
6. Maxted W. R. 1948: Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. *Lancet* **6520** : 255.
7. Mc Carty M., 1952: The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of *Streptomyces albus, J. Exp. Med.*, **96**, : 555 i 569.
8. Pakuła R., 1952: Różnorodność wielocukrów u paciorkowców hemolizujących, *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, **2** : 197.
9. Welsch M., 1941: Bactericidal substances from sterile culture media and bacterial cultures with special reference to the bacteriolytic properties of *Actinomycetes, J. Bact.*, **42** : 801.
10. Welsch M., 1942: Bacteriostatic and bacteriolytic properties of *Actinomycetes. J. Bact.*, **44** : 571.
11. Welsch M., 1947: Phénomenes d'antibiose chez le actinomycetes, J. Dumbot, Gembloux (Belgium).

Acta Microbiologica Polonica Vol. III, No 4

R. Pakuła, M. Tyc i *Wł. Walczak*

BAKTERIOLIZYNY PROMIENIOWCÓW
II. O NIEKTÓRYCH WŁAŚCIWOŚCIACH CZYNNIKA LITYCZNEGO

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Wpłynęło dnia 1.VI.1954 r.

W pierwszej części pracy (Pakuła, Tyc i Walczak, 1954) omówiono warunki powstawania bakteriolizyn i zasięg ich działania. Przedmiotem niniejszego doniesienia będą inne właściwości czynnika litycznego, a mianowicie jego zdolność do hydrolizy fibryny i białek *M* paciorkowców hemolizujących grupy A, jego właściwości antygenowe oraz niektóre obserwacje dotyczące mechanizmu jego działania.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy.

Do produkcji czynnika litycznego używano szczepu z rodzaju *Streptomyces*, oznaczonego jako *nr 15*. Aktywność przesączów i koncentratów badano na paciorkowcach grupy A, należących do różnych typów serologicznych.

Otrzymywanie czynnika bakteriolitycznego

Aktywne przesącze hodowli jak również koncentraty czynnika litycznego przygotowywano w sposób podany w części pierwszej niniejszej pracy.

Badania właściwości fibrynolitycznych

Aktywność fibrynolityczną przesączów i koncentratów badano na skrzepach fibryny, otrzymanych przez dodanie trombiny do fibrynogenu, jak również na włókniku otrzymanym przez rozbijanie pełnej krwi w naczyniu z perełkami szklanymi. W pierwszym przypadku skrzep objętości 1 ml wrzucano do 2 — 3 ml przesączu hodowli, w drugim — skrzep zmywano z perełek fizjologicznym roztworem NaCl i po kilkakrotnym przepłukaniu w tym płynie przenoszono do przesączu hodowli promieniowca. Aktywność fibrynolityczną badano również w następujący sposób: do 0,8 ml roztworu fibrynogenu (frakcja otrzymana przy $^1/_3$ nasyceniu plazmy siarczanem amonowym) dodawano 0,1 ml przesączu w rozmaitych rozcieńczeniach. Probówki wstawiano do łaźni wodnej w temperaturze 37°, a następnie dodawano po 0,1 ml trombiny. Brak skrzepu, przy jednoczesnym jego występowaniu w probówkach, do których dodawano zagotowanego przesączu hodowli, świadczył o właściwościach fibrynolitycznych przesączu.

Pomiar aktywności bakteriolitycznej przesączów i koncentratów

Moc liityczną wobec żywych i martwych paciorkowców oznaczano turbidymetrycznie w fotokolorymetrze Kletta-Sommersona.

Badania aktywności czynnika litycznego wobec antygenów *M Streptococcus pyogenes*

Ze 100 ml hodowli szczepów *S. pyogenes*, należących do różnych typów serologicznych, przygotowywano po 1 ml ekstraktu metodą Lancefield (1928). Do każdego z tych ekstraktów dodawano po 1 ml przesączu hodowli promieniowca, po czym probówki wstawiano do cieplarki (37°) na kilka godzin. Kontrolę stanowiły analogiczne ekstrakty, rozcieńczone zagotowanym (100°) przesączem hodowli promieniowca. Obecność agtygenu *M* w ekstraktach rozcieńczonych nieogrzewanym przesączem i w ekstraktach kontrolnych oznaczono za pomocą odczynu precypitacji z wysyconymi surowicami odpornościowymi homologicznych typów, zawierającymi przeciwciała anty-*M*. Odczyn precypitacji wykonywano we włoskowatych rurkach szklanych metodą Swifta, Wilsona i Lancefield (1943).

WYNIKI

AKTYWNOŚĆ FIBRYNOLITYCZNA

Obmyty włóknik, otrzymany po rozbiciu pełnej krwi w buteleczkach z perełkami szklanymi, po dodaniu do przesączu hodowli promieniowca ulegał rozpuszczeniu w temperaturze 45° już po pół godzinie. Po tym czasie pozostawały drobne, przejrzyste resztki, które całkowicie znikały dopiero po dwóch godzinach. Zwykle do 5 ml przesączu hodowli promieniowca dodawano włóknik otrzymany z 5 ml krwi. Przesącze były tak samo czynne wobec włóknika krwi ludzkiej, końskiej i króliczej.

Skrzepy fibryny ludzkiej, otrzymane przez dodanie trombiny do fibrynogenu, wrzucone do przesączu ulegały podobnemu rozpuszczeniu. Dokładniej aktywność fibrynolityczną mierzono w układzie: fibrynogen (0,8 ml) wzrastające rozcieńczenie przesączu hodowli promieniowca (0,1 ml) trombina (0,1 ml). Zwykle z 20 ml plazmy otrzymywano 100 ml roztworu fibrynogenu. Roztwór fibrynogenu z dodatkiem aktywnego przesączu pozostawiano na przeciąg 30 minut w 37°, a dopiero po tym czasie dodawano trombiny. W probówkach, gdzie znajdował się przesącz w niewielkich rozcieńczeniach, w ogóle nie dochodziło do skrzepnięcia. Ilustruje to tab. I.

Brak skrzepu tłumaczymy rozkładem fibrynogenu przez czynnik proteolityczny, obecny w przesączu hodowli promieniowca.

Po natychmiastowym dodaniu trombiny do mieszaniny fibrynogenu i przesączu w pierwszych probówkach także nie dochodziło do powstania skrzepu, a w następnych powstały skrzep ulegał rozpuszczeniu po upływie różnych okresów czasu (tab. I).

W obu opisanych doświadczeniach przeprowadzono kontrolne badania z ogrzanym w 100° przesączem oraz z jałowym podłożem używanym do hodowli promieniowca. Badania kontrolne wykazały, że ani ogrzewany przesącz, ani jałowe podłoże nie zawierają czynnika rozkładającego fibrynogen lub rozpuszczającego skrzepy fibryny.

Działanie proteolityczne przesączów hodowli promieniowca wykazano także w odczynie na koagulazę gronkowca. Przygotowano dwie próbki plazmy króliczej, każda po 0,1 ml. Do jednej dodano 0,4 ml rozcieńczonego 5-krotnie 0,85% roztworem NaCl przesączu hodowli promieniowca, do drugiej 0,4 ml 0,85% NaCl. Do obu próbek dodano oczko hodowli tego samego szczepu gronkowca koagulazododatniego na stałym podłożu. Obie probówki wstawiono do cieplarki w 37°. W pierwszej w ogóle nie doszło do skrzepnięcia plazmy, w drugiej skrzep wystąpił już po 40 minutach.

Tabela I.

Rozkład fibrynogenu przez przesącz hodowli *Streptomyces nr 15*

Разложение фибриногена фильтратом культуры *Streptomyces nr 15*

The decomposition of the fibrinogen by the filtrate of the culture of *Streptomyces No 15*

Trombina dodana po 30′ przy 37°		Trombina dodana natychmiast		
Rozcieńczenie przesączu	Wystąpienie skrzepu	Rozcieńczenie przesączu	Skrzep wystąpił (czas w minutach)	Rozpuszczenie skrzepu nastąpiło (czas w min.)
1:2	—	1 : 5	—	.
1:4	—	1 : 10	—	.
1:8	—	1 : 20	2	8
1:16	—	1 : 40	2	16
1:32	—	1 : 80	1	29
1:64	±	1 : 160	1	35
1:128	+	1 : 320	1	41

— oznacza brak skrzepu; отсутствие сгустка no clot

+ oznacza obecność skrzepu; наличие сгустка fibrine clot formed

HYDROLIZA BIAŁEK *M* PRZEZ PRZESĄCZ HODOWLI PROMIENIOWCA

Wszystkie ekstrakty paciorkowców, przygotowane metodą Lancefield i rozcieńczone czynnym przesączem hodowli promieniowca, nie reagowały w odczynie precypitacji z homologicznymi, typowymi surowicami odpornościowymi. Natomiast ekstrakty kontrolne, które zawierały ogrzewany przesącz, reagowały dodatnio w tym odczynie. Wynik doświadczenia wskazuje, iż w przesączu hodowli jest obecny czynnik proteolityczny, rozkładający białka *M*.

ANTYGENOWOŚĆ CZYNNIKA LITYCZNEGO

Przesącze hodowli promieniowca, otrzymane metodą zamrażania i odmrażania, po przesączeniu przez filtr Berkefelda wstrzykiwano królikom dożylnie. Do hodowli promieniowca użyto półsyntetycznego podłoża, zawierającego hydrolizat kazeiny jako źródło azotu. W pierwszym tygodniu wstrzykiwano w 3 następujących po sobie dniach po 1 ml, a w następnych po 2 ml. Surowice królików, wykrwawionych po 6 tygodniach, reagowały dodatnio w odczynie precypitacji z przesączem hodowli oraz z koncentratami zawierającymi czynnik liticzny. Ogrzewane w temperaturze 100° przesącze lub koncentraty oraz jałowe podłoże nie dawały odczynu precypitacji. Zatem antygen, który spowodował pojawienie się przeciwciał, jest wytwarzany przez nasz szczep promieniowca, przy czym antygen ten jest ciepłochwiejny.

Ponieważ czynnik liticzny jest również ciepłochwiejny, można sądzić, iż otrzymano przeciwciała swoiście reagujące z czynnikiem litycznym.

Należało się spodziewać, że surowica odpornościowa będzie hamować działanie czynnika litycznego na bakterie. Przypuszczalnie to zostało potwierdzone, jednak nie zdołano wykazać swoistości tego zahamowania. Su-

rowice nieuodpornionych królików również hamowały działanie bakteriolizyn. Przypuszczalnie normalne białka surowicy inaktywują czynnik lityczny.

OBSERWACJE DOTYCZĄCE DZIAŁANIA CZYNNIKA BAKTERIOLITYCZNEGO

Welsch (1941, 1942), Jones Swallow i Webb (1948) oraz Mc Carty (1952) wykazali złożony charakter czynnika litycznego w przesączach hodowli promieniowców. Zdaniem Welscha oraz Jonesa i współpracowników w systemie tym można wyróżnić czynnik bakteriobójczy o charakterze lipoidu oraz złożony system enzymów proteolitycznych. Według Mc Carty'ego rozpuszczenie paciorkowców przez przesącz hodowli promieniowca wymaga najpierw naruszenia struktury błony komórkowej, w skład której wchodzą węglowodany i białka. Dopiero zapoczątkowanie lizy przez czynnik uszkadzający błonę umożliwia doprowadzenie jej do końca przez enzymy proteolityczne, również obecne w przesączu hodowli promieniowca.

Założywszy, że czynnik lityczny jest niejednorodny, a mianowicie, iż jeden jego składnik działa na żywe bakterie, a inny na martwe, należałoby oczekiwać, że warunki powstawania i działania tych składników są odmienne. Usiłowano to sprawdzić w następującym doświadczeniu. W kilku butelkach Roux z podłożem agarowym *D* (patrz część I) posiano zarodniki promieniowca *nr 15*. Hodowlę prowadzono w temperaturze 30°. Po dwóch dobach przerwano wzrost w jednej butelce, wydobyto przesącz metodą zamrażania i odmrażania i określono w fotokolorymetrze czas niezbędny do całkowitego rozpuszczenia 10^9 żywych komórek paciorkowców oraz takiej samej ilości martwych komórek zabitych ogrzewaniem w 56°. Bakterioliza żywych i martwych komórek zachodziła w temperaturze 45°. Podobnie postąpiono z przesączami otrzymanymi z hodowli 3, 4, 5 i 6-dobowej. W każdym przypadku oznaczono czas niezbędny do rozpuszczenia tej samej ilości żywych i martwych paciorkowców. Wynik tych badań uwidoczniono na rys. 1.

Na osi odciętych podany jest czas trwania bakteriolizy w minutach, na osi rzędnych wiek (w dobach) hodowli, z których otrzymano odpowiednie przesącze. Uderzający jest równoległy przebieg obu linii łamanych, obrazujących przebieg lizy żywych i martwych bakterii. Doświadczenie to powtórzono w analogicznych warunkach z tym wyjątkiem, że hodowlę prowadzono w 37° zamiast jak uprzednio w 30°. Wyniki otrzymano analogiczne (rys. 2).

Wyjątek stanowi punkt odpowiadający dwudobowej hodowli w temperaturze 37°, kiedy szybkość lizy żywych i martwych paciorkowców jest taka sama. W pozostałych przypadkach liza martwych bakterii przebiega szybciej niż żywych. Odpowiada to naszym wielokrotnym obserwacjom, iż bardzo aktywne przesącze z hodowli w 37° powodują lizę żywych bakterii z tą samą szybkością, co martwych.

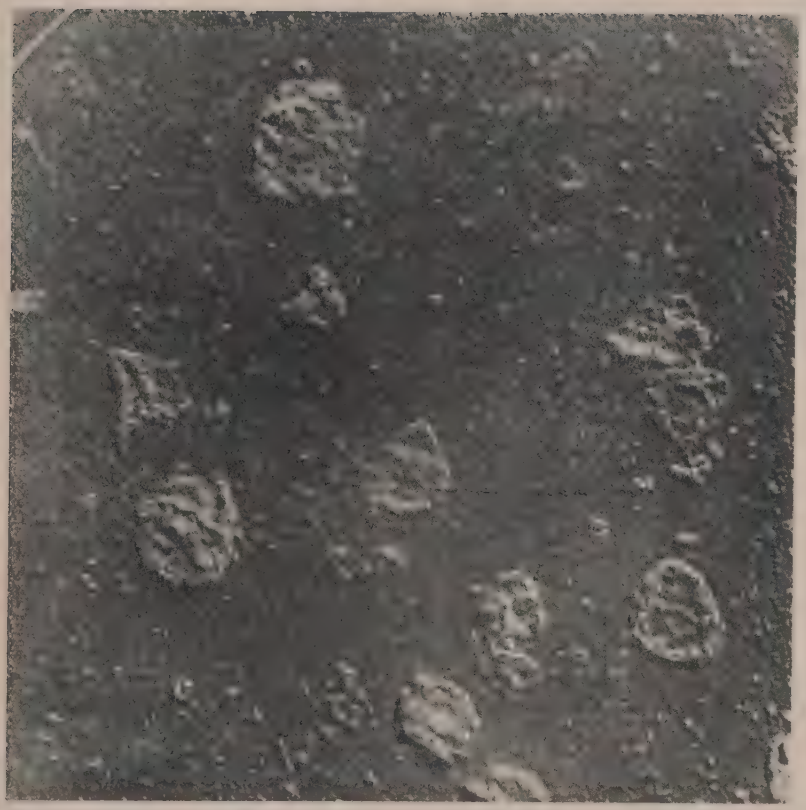
Z naszych spostrzeżeń wynika, że żywe paciorkowce pod wpływem czynnika litycznego tracą zdolność barwienia się dodatnio metodą Grama. Stwierdzono to w następujących doświadczeniach:

Do dwóch próbek przesączu hodowli promieniowca — jednej czynnej, nieogrzewanej, drugiej nieczynnej, ogrzewanej przez 10 minut w 100° — dodano jednakowe ilości żywych paciorkowców. Obie próbki wstawiono do łaźni

Fot. 1. Resztki komórek po 16-minutowym działaniu czynnika litycznego. Preparat cieniowany chromem, 22 000 ×

Фот. 1. Фрагменты клеток после 16-и минутного действия литического фактора. Препарат обработанный хромом. Увел. 22 000.

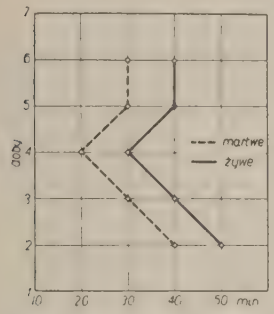
Phot. 1. Desintegrated cells after 16 minutes action of the lytic factor. Chromium shadowed 22 000 ×



Fot. 2. Resztki komórek po 4,5-godzinnym działaniu czynnika litycznego. Preparat cieniowany chromem, 22 000 ×

Фот. 2. Фрагменты клеток после действия литического фактора через 4,5 часа. Препарат обработанный хромом. Увел. 22 000.

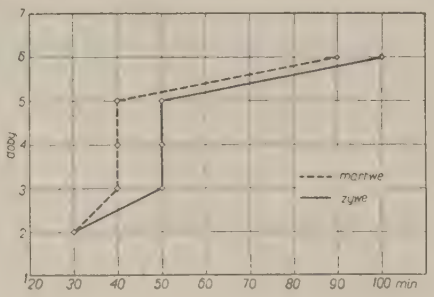
Phot. 2. Desintegrated cells after 4,5 hours action of the lytic factor. Chromium shadowed 22 000 ×



Rys. 1. Aktywność lityczna przesączów hodowli 2—6 dobowych w temperaturze 30° w stosunku do żywych i martwych paciorkowców

Рис. 1. Литическая активность 2—6 суточных культур выращиваемых в температуре 30° по отношению к живым (——) и мертвым (- - - -) стрептококкам

Fig. 1. The influence of the incubation temperature upon the lytic activity of the filtrates of 2 — 6 days cultures, Temperature of incubation 30° ———— living streptococci — — — — dead streptococci



Rys. 2. Aktywność lityczna przesączów hodowli 2—6 dobowych wyrosłych w temperaturze 37° w stosunku do żywych i martwych paciorkowców

Рис. 2. Литическая активность фильтратов 2 — 6 суточных культур выращиваемых в температуре 37° по отношению к живым (———) и мертвым (- - - -) стрептококкам

Fig. 2. The influence of the incubation temperature upon the lytic activity of the filtrates of 2 — 6 days cultures. Temperature of incubation 37° ——— dead streptococci, ———— living streptococci

o temperaturze 45°; po pięciu minutach przygotowano preparaty z obu próbek na tym samym szkiełku i barwiono metodą Grama. Podobne badania wykonano z materiałem pobieranym z obu próbek przesączu w odstępach 5-minutowych. W wyniku stwierdzono, że ani barwliwość, ani kształt komórek w próbce kontrolnej (przesącz zagotowany) nie ulegają zmianie. W próbce czynnej już po 5 minutach część komórek barwi się metodą Grama ujemnie, a po 10 minutach obecne są tylko pojedyncze komórki barwiące się dodatnio. W próbkach pobranych później stwierdza się stopniowy zanik komórek, a na ich miejsce pojawia się bezkształtna masa barwy czerwonawej, której ilość stopniowo się zmniejsza. Pozostają jedynie nieliczne komórki gramdodatnie, które przez cały okres obserwacji, trwający około 2 godzin, nie ulegają zmianie. Zmiany zachodzące w komórkach pod wpływem działania czynnika litycznego badano również w mikroskopie elektronowym.

Na załączonych zdjęciach (fot. 1 i 2) widać, iż z komórek pozostają jedynie płaskie twory o zarysach odpowiadających pierwotnemu kształtowi komórek, pozbawione jednak wewnętrznej zawartości. Jednocześnie stwierdzono, że nieliczne komórki pozostają niezmienione nawet po dłuższym działaniu czynnika, podczas gdy dla zakończenia lizy olbrzymiej większości wystarczy 20—30 minut. Być może, że są to właśnie te komórki, których barwliwość w metodzie Grama po zadziałaniu czynnika litycznego nie ulega zmianie.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Obecność enzymu lub zespołu enzymów proteolitycznych w przesączach hodowli paciorkowców, rozpuszczających martwe bądź żywe bakterie, nie ulega wątpliwości. Jones ze współpracownikami wykazali, iż przesącze te hydrolizują kazeinę, pepton, edestynę, żelatynę i albuminę. Stwierdzona przez nas obecność fibrynolizyn a także enzymu niszczącego białka *M* paciorkowców hemolizujących grupy *A* rozszerza powyższe dane i potwierdza szeroki zasięg działania wspomnianych proteaz. Jednakże działanie ich wydaje się niedostateczne do rozpuszczenia martwych lub żywych paciorkowców. Wiadomo bowiem, iż trypsyna, chymotrypsyna, pepsyna oraz papaina powodują zniszczenie powierzchniowych antygenów *M*, nie wpływając jednak na żywotność komórek. (Lancefield 1941). Długotrwałe działanie wymienionych enzymów powoduje także przejście do roztworu antygenów *T* (Lancefield i Dole 1946, Pakuła 1951). Nigdy nie dochodzi jednak przy tym do rozpuszczenia martwych, a tym bardziej żywych paciorkowców. Fakty te wskazują, że w bakteriolizie bierze udział inny jeszcze czynnik, odmiennej natury niż enzymy proteolityczne, pod wpływem którego komórki stają się podatne na działanie lityczne proteaz.

Wiadomo, że przesącze hodowli promieniowców działają tylko na martwe bakterie gramujemne, a nie na żywe. Na tej podstawie niektórzy badacze sądzą, że rozpuszczenie bakterii gramdodatnich może zajść po uprzednim usunięciu kompleksu, od którego zależy barwienie się bakterii dodatnio metodą Grama. Przekonaliśmy się, iż rzeczywiście po krótkim działaniu czynnika litycznego paciorkowce zaczynają barwić się metodą Grama ujemnie. Zmiany barwliwości nie możemy jednak łączyć z obecnością w przesączu rybonukleazy, jak to wykazali już Muggleton i Webb (1952), ponieważ nasze przesącze zawierały jedynie ślady tego enzymu, podobnie zresztą jak i przesącze otrzymane przez McCarty'ego.

Opisane wyżej badania (rys. 1 i 2) wykazują zupełną równoległość narastania i zanikania czynnika rozpuszczającego żywe i martwe bakterie w miarę trwania hodowli. Stwierdzono to zarówno w przesączach otrzymanych z hodowli w temperaturze 30°, jak i 37°.

Stwierdziliśmy wprawdzie niejednokrotnie, że przesącze otrzymane z różnych podłoży i w różnych warunkach wykazują niejednakową moc liityczną. Jednak mało aktywne przesącze działały słabo zarówno na martwe, jak i na żywe bakterie. Nigdy nie znaleziono przesączu hodowli promieniowca aktywnego w stosunku do martwych bakterii gramdodatnich i gramujemnych, a nie działającego jednocześnie na żywe paciorkowce. Stwierdzono także, że liza zarówno żywych, jak i martwych bakterii przebiega szybciej w 45° niż w 37°. Wszystkie te fakty wyraźnie wskazują, że liza żywych i martwych bakterii powodowana jest przez ten sam czynnik lub jeśli przez różne czynniki, to ściśle ze sobą związane.

Obrazy otrzymane w mikroskopie elektronowym po zadziałaniu na paciorkowce koncentratem przesączu promieniowca są podobne do obrazu przedstawionego w pracy McCarty'ego. Obraz ten ilustruje resztki komórek paciorkowców, otrzymane po ich mechanicznym rozbiciu i następnym zadziałaniu enzymami proteolitycznymi i nukleazami.

Resztki te były oporne na działanie papainy, pepsyny i lizozymu a także enzymów proteolitycznych zawartych w przesączu hodowli promieniowca, ule-

gały natomiast łatwemu rozpuszczeniu w pełnym przesączu promieniowca. W wyniku działania aktywnego przesączu na paciorkowce otrzymaliśmy zatem obrazy resztek komórek, bardzo podobne pod względem morfologicznym do obrazu resztek komorek otrzymanych w zupełnie odmienny sposób przez Mc Carty'ego.

Szczególnie godny podkreślenia jest fakt, że twory widoczne na naszych zdjęciach pojawiły się już po 10 minutach działania na paciorkowce czynnikiem litycznym i nie znikały w ciągu 4,5 godziny. Jest więc mało prawdopodobne, by dłuższe działanie spowodowało ich rozpuszczenie. Fakty te trudno wyjaśnić. Można jedynie przypuścić, że twory widoczne na zdjęciach Mc Carty'ego mimo podobieństwa morfologicznego mają inną budowę chemiczną, albo że otrzymany przez tego badacza czynnik lityczny jest odmiennej natury.

Pierwsze przypuszczenie jest bardzo prawdopodobne. Wszak twory widoczne na naszych zdjęciach i zdjęciach Mc Carty'ego otrzymano w zupełnie odmienny sposób. Drugie przypuszczenie wymagałoby założenia, że mechanizmy bakteriolizy wywołanej przez różne szczepy promieniowców nie są jednakowe. Czy takie założenie jest dopuszczalne? Wydaje się, że tak. Wiemy przecież, że substancje antybiotyczne, tak licznie wytwarzane przez promieniowce są różnorodne pod względem chemicznym. Można więc zaryzykować przypuszczenie, że mechanizmy bakteriolizy, która w istocie rzeczy jest procesem antybiotycznym, mogą także być różnorodne.

Panu mgrowi inż. A. Feltynowskiemu wyrażamy serdeczne podziękowanie za wykonanie zdjęć w mikroskopie elektronowym.

P. Пакула, М. Тыц и В. Вальчак

БАКТЕРИОЛИЗИНЫ У АКТИНОМИЦЕТОВ. II. О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ЛИТИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Резюме

Предметом исследований была бактериолитическая и протеолитическая активность, проявляемая одним штаммом актиномицетов. Фильтрат культуры этого штамма, а также концентраты литического фактора проявляли большую фибринолитическую активность и кроме того гидролизировали белки *M*, экстрагированные из гемолизирующих стрептококков группы А. Установлено, что литический фактор имеет характер антигена. На основании более точных наблюдений оказалось, что в культурах этого штамма актиномицетов литические факторы, действующие на живые и мертвые бактерии, возрастают и исчезают параллельно. Оптимальные условия для активности литического фактора по отношению к живым и мертвым бактериям одни и те же. На основании выше указанных фактов можно предполагать, что в фильтратах культуры исследуемого штамма актиномицетов имеется один и тот же фактор, действующий как на живые, так и на мертвые бактерии.

R. Pakuła, M. Tyc and *W. Walczak*

THE BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*. II. SOME PROPERTIES OF THE LYTIC FACTOR

Summary

The bacteriolytic and proteolytic activity of one strain of *Streptomyces* was studied. Culture filtrates of this strain, as well as the crude concentrates of the lytic factor, were highly fibrynolytic and caused hydrolysis of the extracts of *M* antigen of *Streptococcus pyogenes*. The antigenic properties of the lytic factor was confirmed.

Observations have shown that the bacteriolytic activity of cultures of the tested *Streptomyces* strain against living and dead streptococci increases and disappears simultaneously. The optimal conditions for lysis of living and dead bacteria are the same. These observation suggest that there is only one single factor acting on living and dead bacteria

LITERATURA

1. Jones A. S., Swallow A. J. a. Webb A.. 1948: The exocellular bacteriolytic system of soil *Actinomyces, Biochim. Biophys. Acta,* **2** : 167.
2. Lancefield R. C., 1928: The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus, J. Exp. Med.,* **47** : 481.
3. Lancefield R. C., 1940 — 41: Specific relationship of cell composition to the biological activity of hemolytic streptococci, *The Harvey lectures,* 36.
4. Lancefield R. C. a. Dole V. P., 1946: The properties of T antigens extracted from group A hemolytic Streptococci, *J. Exp. Med.,* **84** : 449.
5. Mc Carty M., 1952: The lysis of group A hemolytic Streptococci by extracellular enzymes of *Streptomyces albus, J. Exp. Med.,* N° 6 : 555 i 569.
6. Muggleton P. W. a. Webb M., 1952: The exocellular system of soil *Actinomyces, Biochim. Biophys. Acta,* **8** : 431.
7. Pakuła R., 1951: Extraction of the T Antigen of *Streptococcus pyogenes, J. Gen. Microbiol.,* **5** : 640.
8. Pakuła R., Tyc M. i Walczak W., 1953: Aktywność bakteriolityczna szczepu *Sarcina lutea, Acta Microbiol. Polon.,* **2** : 293.
9. Pakuła R., Tyc M. i Walczak W., 1954: Bakteriolizyny promieniowców I. Otrzymywanie bakteriolizyn I. Zasięg oraz warunki działania, *Acta Microbiol. Polon.,* **3** : 363.
10. Swift H. F., Wilson A. T. a. Lancefield R. C., 1943: Typing group A hemolytic Streptococci by *M* precipitin reactions in capillary pipettes, *J. Exp. Med.,* 78 : 127.
11. Welsch M., 1941: Bactericidal substances from sterile culture media and bacterial cultures with special reference to the bacteriolytic properties of *Actinomycetes, J. Bact.,* **42** : 801.
12. Welsch M., 1942: Bacteriostatic and bacteriolytic properties of *Actinomycetes, J. Bact.,* **44** : 571.

Acta Microbiologica Polonica Vol. III No 4.

A. Nowotny-Mieczyńska i *M. Ruszkowska*

WPŁYW MINERALNEGO AZOTU NA ROZWÓJ ROŚLIN MOTYLKOWYCH, CZĘŚĆ II

Z Działu Żywienia i Nawożenia I.U.N.G. Oddział Puławy

Wpłynęło dnia 18.II.1954 r.

W pierwszej części naszych badań (1953) nad wpływem mineralnego azotu na rozwój szczepionych roślin motylkowych zwróciliśmy uwagę, że ogólnienie sposobu reagowania poszczególnych roślin motylkowych na wzrastające stężenia azotu w odżywczym środowisku tych roślin nie jest właściwe. Badania nasze wykazały bowiem, że różne gatunki roślin motylkowych po zaszczepieniu ich aktywnym szczepem *Rhizobium* rozwijają się różnie w zależności od stężenia mineralnego azotu w podłożu. Między innymi stwierdziliśmy, że groch mając do wyboru dwa źródła azotu: azot mineralny (w saletrze potasowej czy amonowej) i azot atmosferyczny wybiera raczej azot związany, dając plon tym większy, im wyższe jest stężenie mineralnego azotu w podłożu. Równocześnie brodawkowanie korzeni staje się coraz to słabsze i ustaje zupełnie przy dawce 500 mg N na 10 kg piasku. Seradela natomiast, nawet przy znacznym stężeniu mineralnego azotu w podłożu, wybiera azot atmosferyczny, pozostawiając azot mineralny prawie nietknięty. Koniczyna, lucerna, soja, łubin (żółty) reagują niemile na duże stężenie mineralnego azotu w środowisku odżywczym, ale przy miernym stężeniu tego azotu rozwijają się dobrze, czerpiąc prawdopodobnie część azotu z atmosfery, a część z podłoża. Badania te przeprowadzano przeważnie tylko z saletrą potasową jako źródłem mineralnego azotu.

W związku z powyższymi obserwacjami przeprowadzano w dwóch następnych sezonach wegetacyjnych (1952 i 1953) dalsze badania z tego zakresu, stawiając sobie za cel choćby częściowe wyjaśnienie następujących zagadnień:

1) Sposób reagowania wyki i fasoli na wzrastające stężenie saletry potasowej w pożywce.

2) Wpływ dwóch różnych form azotu: saletry potasowej i saletry amonowej na rozwój żółtego (słodkiego) łubinu oraz lucerny.

3) Trzecie zagadnienie dotyczyło wysuniętego w części I niniejszej pracy pytania: czy rośliny motylkowe, zaszczepione hodowlami *Rhizobium* i równocześnie zasilone mineralnym azotem, czerpią azot z obu tych źródeł, czy też tylko wyłącznie z jednego — albo z atmosfery, albo z pożywki mineralnej? Doświadczenia prowadzono z łubinem i lucerną.

Wszystkie doświadczenia prowadzono w możliwie jednolitych warunkach. Założono je w wazonach mitscherlichowskich o pojemności 10 kg piasku. Piasek do badań płukano kilkakrotnie w wodzie wodociągowej, a następnie w wodzie destylowanej. Jako podstawowe nawożenie na 10 kg piasku dano: 0,35 g K_2HPO_4, 0,25 g KH_2PO_4, 0,30 g $MgSO_4$, 8 mg H_3BO_3, 0,2 mg $CuSO_4$, 2 mg $MnSO_4$; ponadto łubin otrzymał 2 g $CaCO_3$, wyka i fasola po 6 g $CaCO_3$ na wazon. Nawożenie to (oprócz $CaCO_3$) stosowano w 2 dawkach: pierwszą przedsiewnie, drugą w okresie poprzedzającym kwitnienie roślin. Azot stosowano przedsiewnie (do całej ilości piasku) w postaci saletry potasowej lub saletry amonowej w ilościach od 10 — 500 mg N na 10 kg piasku, zawsze w jednej dawce. Wilgotność piasku utrzymywano na poziomie 60% całkowitej pojemności wodnej piasku. Nasiona badanych przez nas roślin szczepiono hodowlami bakterii symbiotycznych, otrzymanymi z Działu Mikrobiologii Rolniczej I. U. N. G. Puławy. Badania prowadzono w dwóch sezonach wegetacyjnych: w roku 1952 i 1953.

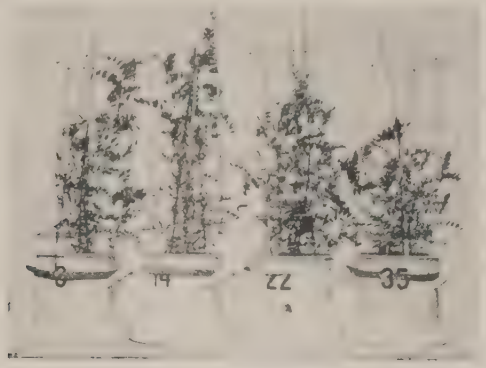
OPIS I WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

DOŚWIADCZENIE I (1952). WPŁYW WZRASTAJĄCYCH DAWEK SALETRY POTASOWEJ NA ROZWÓJ FASOLI I WYKI

Doświadczenie z fasolą (odmiana karłowa) i wyką składało się z 4 serii, w każdej po 6 powtórzeń (tab. I). W każdym wazonie rosły po 4 rośliny. Siew obu roślin nastąpił 12. V. Dojrzewanie fasoli: 17. VII., wyki 29. VII. W trzy tygodnie po wschodach roślin obserwowano w zapasowych wazonach po raz pierwszy stan brodawkowania korzeni roślin, drugi raz w okresie poprzedzającym kwitnienie. Doświadczenie z obu roślinami ukończono w okresie dojrzewania strąków.

Rozwój roślin: w pierwszych 4 tygodniach po wschodach zarówno wyka, jak i fasola rozwijały się niezmiernie słabo przy najniższych dawkach saletry (10 i 50 mg N na wazon). Liście ich miały jasnozielone zabarwienie, na korzeniach nie było zupełnie brodawek. Równocześnie, rośliny uprawiane w seriach z dawką 100 mg N miały zdrowy wygląd i już przy pierwszej kontroli korzeni znaleziono wyraźne brodawki, zabarwione na kolor różowy. Byłoby to dowodem, że dawka 50 mg N, a zwłaszcza dawka 10 mg N, były zbyt niskie do przełamania głodu azotowego i wywołania symbiozy; w tych warunkach symbioza kształtowała się bardzo powoli. Notujemy to dlatego, że podobne zjawisko obserwowałyśmy w równocześnie prowadzonym doświadczeniu z soją nad fosforowym odżywianiem się tej rośliny. Jak wiadomo, procesy symbiotyczne w roślinach rozpoczynają się dopiero wtedy, gdy stosunek C : N w roślinie osiągnie maksymalny poziom. Być może, że w doświadczeniach z soją, wyką i fasolą poziom ten osiągały rośliny dopiero przy dawce 100 mg N na wazon. Musimy tu jednak zaznaczyć, że tak wysokie zapotrzebowanie na azot mogło wyniknąć z użycia mało aktywnego szczepu *Rhizobium*. Ponadto i warunki atmosferyczne mogły osłabić działalność stosowanych przez nas bakterii symbiotycznych. Wiosna była bardzo zimna, a lato suche i upalne.

Gdy już wszystkie rośliny weszły najwidoczniej w stadium wiązania wolnego azotu (co ujawniło się w ciemnej zieleni liści) i zaczęły stopniowo zakwitać, zanotowano następującą różnicę w reagowaniu na różne stężenia azotu w piasku: fasola rozwijała się tym bujniej, im wyższe było stężenie azotu, wyka natomiast zachowała się odwrotnie: przy najwyższej dawce (500 mg N na wazon) wykazywała pewną depresję wzrostu. Poniżej załączamy zdjęcie obu roślin z okresu kwitnienia.



Fot. 1. Wpływ różnych dawek KNO_3 na rozwój wyki. KNO_3 na wazon: 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg
Влияние разной величины доз KNO_3 на развитие вики (10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg KNO_3 на 1 сосуд).
The influence of various dosis of KNO_3 upon the growth of vetch. KNO_3 on the pot: 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg

Fot. 2. Wpływ różnych dawek KNO_3 na rozwój fasoli. KNO_3 na wazon:. 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg
Влияние разной величины доз KNO_3 на развитие фасоли (10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg KNO_3 на 1 сосуд).
The influence of various dosis of KNO_3 upon the growth of bean. KNO_3 on the pot: 10 mg, 50 mg, 100 mg, 500 mg

W miarę jak rośliny dojrzewały, wyjmowano je z wazonów, oznaczano plon suchej masy i analizowano na zawartość ogólnego azotu. W tabeli I zestawiono wyniki doświadczenia.

Tabela I

Wpływ wzrastających dawek KNO_3 na plon szczepionych roślin: fasoli i wyki
Влияние возрастающих доз KNO_3 на урожайность инокулированных растений: фасоли и вики
The influence of different amounts of KNO_3 upon the yield of inoculated beans and vetch.

L. p. serii	Ilość N na wazon mg	Fasola				Wyka			
		Sucha masa średnio z 1 wazonu							
		Plon Całych roślin g	N w plonie mg	Plon Ziarna g	N w plonie mg	Plon Całych roślin g	N w plonie mg	Plon Ziarna g	N w plonie mg
1	10	16,83 ± 1,58	401	4,83 ± 0,75	198	24,27 ± 1,0	560	5,66 ± 0,96	259
2	50	18,56 ± 0,63	426	6,20 ± 0,50	232	26,86 ± 0,73	605	5,42 ± 0,69	250
3	100	21,46 ± 1,55	508	8,31 ± 0,83	302	25,51 ± 2,80	596	6,13 ± 1,08	283
4	500 x/	25,53 ± 1,91	500	6,60 ± 0,50	240	21,98 ± 0,53	464	2,20 ± 0,27	101
5	500	25,17 ± 0,95	568	9,01 ± 0,49	345	—	—	—	—

*) 500 mg N dano w 5 dawkach po 100 mg w tygodniowych odstępach.

Z zestawienia tego widać, że dawka 100 mg N na wazon była dla obu roślin najkorzystniejszą, 500 mg N była dla wyki dawką szkodliwą, zwłaszcza ze względu na produkcję ziarna, gdy dla fasoli ta duża ilość azotu była korzystna. Rozdzielenie dużej dawki na 5 dawek mniejszych wpłynęło szczególnie korzystnie na rozwój fasoli i plon jej ziarna.

Nodulacja korzeni roślin w chwili zakończenia doświadczenia przedstawiała się następująco: fasola nie miała zupełnie brodawek w serii 4 (500 mg N na wazon), gdy tymczasem na korzeniach wyki wystąpiły brodawki, ale drobne i nieliczne. Najsilniejszą nodulację u wyki stwierdzono w serii 3 (100 mg N na wazon), u fasoli natomiast w serii 1 i 2 (10 i 50 mg N na wazon).

Z badań powyższych wynikałoby, że fasola z łatwością może czerpać i zużywać azot mineralny z podłoża przy równoczesnym zahamowaniu procesów symbiotycznego wiązania wolnego azotu. Wyka natomiast korzysta prawdopodobnie równocześnie z obu źródeł azotu: mineralnego i atmosferycznego.

DOŚWIADCZENIE II (1952) WPŁYW NH_4NO_3 I KNO_3 NA ROZWÓJ ŻÓŁTEGO ŁUBINU

Plan tego doświadczenia zamieszczony jest w tabeli III. Każda seria składała się z 6 powtórzeń, w każdym wazonie rosły 4 rośliny. Żółty (słodki) łubin zaszczepiono hodowlami *Rhizobium lupini*. Doświadczenie zakończono, gdy większość roślin zakwitła.

Zaobserwowaliśmy, że rośliny zasilone wzrastającymi dawkami saletry amonowej rozwijały się od początku lepiej aniżeli w analogicznych seriach z saletrą potasową. Przy najwyższej dawce saletry potasowej (500 mg N

na wazon) rośliny były żółte i niektóre z nich nawet zginęły nie doszedłszy do stadium kwitnienia. Natomiast w analogiczne, serii z saletrą amonową rozwój roślin był tylko nieco zahamowany, mianowicie kwitnienie ich było opóźnione (w chwili zakończenia doświadczenia jeszcze nie kwitły). Możliwe jednak, że w razie odstąpienia od zasady jednoczesnego zbioru wszystkich doświadczalnych roślin i pozwolenia na dalszy ich wzrost „dogoniłyby" one rośliny zasilone niższymi dawkami saletry amonowej, które w chwili zbioru były już w pełnym kwieciu.

Odczyn piasku badano po raz pierwszy zaraz po wschodach roślin i stwierdzono, że bez względu na wysokość dawki azotu i jego formę pH gleby wahało się od 6,9—7,0, natomiast w okresie poprzedzającym kwitnienie roślin odczyn przedstawiał się następująco:

Tabela II

Wpływ różnych dawek i form azotu na odczyn piasku

Влияние различной величины доз и разного рода азотных минеральных удобрений на pH песка.

The influence of the amount and the form of nitrogen salts on the pH of sand

Ilość N na wazon w mg	N jako KNO_3	N jako NH_4NO_3
	pH piasku	
10	6,9—7,0	6,9—7,0
100	6,9—7,0	6,9—7,0
250	6,9—7,1	6,9
500	7,1—7,2	6,7

Z zestawienia tego widać, że w czasie rozwoju roślin w seriach nawożonych saletrą potasową nastąpiło lekkie zalkalizowanie, a w seriach z saletrą amonową nieznaczne zakwaszenie środowiska odżywczego roślin.

Gdy większość roślin zakwitła, wyjmowano je z wazonów, płukano, suszono i oznaczano plon suchej masy i ogólną zawartość azotu. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli III.

Z zestawienia tego widać, że duże dawki azotu (250 i 500 mg N na wazon bez względu na formę saletry) hamowały rozwój roślin, ale że hamowanie przez saletrę potasową było znacznie silniejsze niż przez saletrę amonową. Z tabeli tej widać również, że rośliny uprawiane na saletrze amonowej przyswajały z reguły znacznie większe ilości ogólnego azotu niż rośliny uprawiane na saletrze potasowej. Zwracają tu szczególną uwagę serie 1, w których rośliny mogły pobrać azot tylko z atmosfery.

Brodawkowanie korzeni badano w okresie kwitnienia roślin i stwierdzono, że w seriach nawożonych saletrą amonową brodawek było więcej i że były one większe aniżeli w analogicznych seriach nawożonych saletrą potasową, zwłaszcza w serii z najkorzystniejszą dawką azotu, tj. 100 mg N na wazon. Natomiast w seriach z najwyższą dawką azotu znaleziono tylko gdzieniegdzie niedużej brodawki o jasno różowym zabarwieniu.

Tabela III

Wpływ wzrastających dawek KNO_3 i NH_4NO_3 na rozwój żółtego łubinu

Влияние возрастающих доз KNO_3 и NH_4NO_3 на развитие желтого люпина

The influence of different amounts of KNO_3 and NH_4NO_3 upon the yield of yellow lupine

L.p. serii	Ilość N na wazon	Nawożenie KNO_3		Nawożenie NH_4NO_3	
		Sucha masa śr. z 1 wazonu			
		Plon	N w plonie cał. rośl.	plon	N w plonie cał. rośl.
	mg	g	mg	g	mg
1	10	31,0 ± 0,69	895	33,3 ± 0,76	980
2	100	29,7 ± 1,05	863	34,0 ± 0,60	1028
3	250	23,5 ± 1,26	702	29,4 ± 1,12	928
4	500	3,2 ± 0,07	93	14,9 ± 0,25	433

Aby wyjaśnić, z jakiego źródła czerpały rośliny azot przy wyższych dawkach azotu w piasku, przeprowadzono następne doświadczenie (III).

DOŚWIADCZENIE III (1953). PRÓBA OKREŚLENIA ILOŚCI N POBRANEGO Z PIASKU I Z ATMOSFERY PRZEZ ŁUBIN I LUCERNĘ.

Po wyjęciu łubinu (z poprzedniego doświadczenia) z korzeniami z piasku całą ilość piasku z wazonów odsiewano dokładnie na sicie od oderwanych korzonków, po czym wsypywano ją z powrotem do tego samego wazonu. Następnie cały system korzeniowy płukano w wodzie destylowanej, zużywając przy tym dwa razy po 200 ml destylowanej wody. Wodę tę wlewano do wazonu, z którego wyjęto łubin. Dzięki tym zabiegom ubytek piasku z wazonów po usunięciu z nich łubinów był minimalny i nie zachodziła obawa pozostawienia w piasku resztek korzeni łubinu. W ten sposób napełnione ponownie piaskiem wazony, zasilono pełną pożywką mineralną z wyjątkiem azotu i obsiewano owsem w ilości po 15 roślin na wazon.

Rozwój owsa doprowadzono do okresu kłoszenia się, po czym wyjmowano rośliny wraz z korzeniami z wazonów, płukano, suszono i oznaczano w nich zawartość ogólnego azotu.

Zaobserwowano, że najlepiej rozwijał się owies w serii 4, tzn. tej, która podczas uprawy łubinu otrzymała 500 mg N jako KNO_3 na wazon, natomiast w serii z taką samą dawką azotu w NH_4NO_3 — znacznie gorzej. Zasługuje na uwagę fakt, że w seriach: 1 i 2 (po 10 i 100 mg N na wazon) rozwój owsa był prawie jednakowy niezależnie od formy azotu i że nawet rośliny 1 serii (10 mg N na wazon) wykłosiły się. W tabeli IV zestawiono wyniki tego doświadczenia.

Z zestawienia tego wynikałoby, że w serii 1 (10 mg N na wazon) rośliny *) pobrały więcej azotu, niż go mogły znaleźć w piasku, że więc azot ten mógł pochodzić albo z rozkładu nie zauważonych przy sprzęcie łubinu

*) w 15 ziarnach owsa znajduje się tylko 11,4 mg N.

resztek korzeni, albo — co wydaje się bardziej prawdopodobne — z azotu, który wydzieliły brodawki korzeniowe łubinu uprawianego poprzednio na tym samym piasku.

Z badań Virtanena i współpracowników (1933), Nicola (1934) Thorntona (1936) a także i naszych poprzednich (Nowotny — Mieczyńska 1952) wiadomo, że rośliny motylkowe w okresie największego nasilenia wiązania wolnego azotu część nie wykorzystanego przez roślinę azotu mogą wydzielić do podłoża, i że z tego azotu mogą korzystać rośliny niemotylkowe, rosnące w ich sąsiedztwie lub po nich następujące.

Tabela IV

Plony owsa uprawianego po sprzęcie żółtego łubinu
Урожайность овса, посеянного после желтого люпина
The yield of oats grown after the harvest of lupine

L. p. serii	Ilość N na wazon mg	Nawożenie KNO_3		Nawożenie NH_4NO_3	
		Sucha masa śr. z 1 wazonu			
		Plon całych roślin g	N w plonie mg	Plon całych roślin g	N w plonie mg
1	10	3,99 ± 0,44	34	3,51 ± 0,28	34
2	100	4,40 ± 0,28	36	3,20 ± 0,37	24
3	250	4,12 ± 0,36	48	4,90 ± 0,49	45
4	500	11,73 ± 0,43	188	8,84 ± 0,43	57

Z tabeli IV wynikałoby też, że łubin w serii 2 i 3 czerpał azot nie tylko z atmosfery, ale i znaczne ilości z piasku. Natomiast w serii 4 (500 mg N KNO_3 na wazon) plon owsa był wysoki i bogaty w azot, gdy poprzedzający go plon łubinu był bardzo niski i ubogi w azot. Byłoby to dowodem, że w tej serii łubin pobierał bardzo mało azotu zarówno z podłoża, jak i z atmosfery.

W analogicznej serii z NH_4NO_3 sprawa przedstawiała się odmiennie. Słabe brodawkowanie korzeni łubinu (dowód słabego wiązania wolnego N) i mała ilość azotu, pobrana przez owies rosnący po łubinie, utwierdza nas w przekonaniu, że łubin tej serii pobrał azot głównie z piasku, a tylko nieznaczną część symbiotycznie. Tak więc duże dawki saletry potasowej hamują funkcję wiązania wolnego azotu, a same przez się są trudno przyswajalne przez łubin. Roślina w takich warunkach pobierała N z obu źródeł, ale i stąd i stamtąd pobierała go bardzo słabo.

DOŚWIADCZENIE Z LUCERNĄ.

Doświadczenie to podzielono na dwie części: w części A badano rośliny, które zakażono *Rhizobium meliloti*, w części B rośliny nie szczepione, które przez cały okres wegetacji chroniono przed zakażeniem. W części A piasek, na którym miały rosnąć rośliny doświadczalne, sterylizowano przez wyzarzenie go w suszarce elektrycznej w temperatu-

rze 150°. Pożywkę sporządzono na wodzie destylowanej i przegotowanej; woda służąca do podlewania roślin (destylowana) również była przed użyciem gotowana. Wazony osłonięte były przez cały czas wegetacji gazą wystarczająco gęstą, aby zatrzymać pył, ale nie utrudniającą dostępu światła i powietrza.

Ziarno roślin zaszczepiono hodowlami bakterii *Rhizobium*, otrzymanymi z Zakładu Mikrobiologii Rolnej I. U. N. G.

W przypadku, gdy po upływie trzech tygodni od daty wschodów roślin nie zaobserwowano na ich korzeniach nawet śladu brodawek i rośliny w seriach z niskimi dawkami mineralnego N rozwijały się bardzo słabo, a rośliny w seriach z większymi dawkami — dobrze, zaszczepiono wszystkie rośliny powtórnie innym szczepem. W niedługim czasie potem pojawiły się brodawki i rośliny serii o niskim stężeniu N zaczęły szybko rosnąć i „dopędzać" rośliny o zaawansowanym wzroście w seriach z 250 i 500 mg N na wazon.

W doświadczeniu tym zwrócono uwagę na zmiany w odczynie piasku podczas wegetacji roślin. Pomiary odczynu przeprowadzono 4-krotnie w ciągu rozwoju wegetacji i wyniki ich zestawiono w tabeli V.

Tabela V

Odczyn piasku w różnych okresach rozwoju lucerny
pH песка в разных стадиях развития люцерны
pH of the sand in different phases of the growth of lucerne

L.p. serii	Ilość N na wazon mg	Daty pomiarów pH			
		25.VII*	10.VIII	26.VII	5.IX**
		Nawożenie KNO_3			
1	10	7,2	7,2	7,2	7,1
2	100	7,2	7,3	7,1	7,1
3	250	7,2	7,3	7,1	7,1
4	500	7,3	7,3	7,3	7,3-7,4
		Nawożenie NH_4NO_3			
1	10	7,3	7,3	7,1	7,1
2	100	7,3	7,1	7,1	6,9
3	250	7,1	6,9	6,9	6,9
4	500	6,9	6,9	6,9	6,8

*) 10 dni po wschodach
**) Przed zbiorem roślin

Jak widać, w seriach nawożonych saletrą potasową podłoże stopniowo alkalizowało się, w seriach z saletrą amonową ulegało pod koniec wegetacji roślin lekkiemu zakwaszeniu.

Obserwacje wykazały, że zarówno w seriach roślin szczepionych (A), jak i nie szczepionych (B) rośliny przy nawożeniu saletrą potasową rozwijały się gorzej niż nawożone saletrą amonową.

Po przekwitnięciu roślin (serie szczepione zakwitły o 3—4 dni wcześniej niż nie szczepione) doświadczenie zakończono i przeprowadzono obserwacje nad stanem brodawkowania ich korzeni. Stwierdzono, że rośliny szczepione i zasilone azotanem amonu, bez względu na stężenie N w piasku,

miały brodawki większe i liczniejsze (przeważnie już zielone) niż rośliny tej samej grupy, ale zasilone saletrą potasową. Przy obserwacji roślin nie szczepionych stwierdzono, że korzenie roślin nawożonych KNO_3 nie miały zupełnie brodawek, gdy tymczasem roślin nawożonych saletrą amonową nie udało się uchronić przed zakażeniem. Na ich korzeniach wystąpiły bardzo drobne i nieliczne brodawki o wyraźnie różowym zabarwieniu.

Różowe zabarwienie byłoby dowodem, że zakażenie nastąpiło nie na początku wegetacji, ale dopiero znacznie później, ponieważ brodawki roślin szczepionych były w chwili likwidacji doświadczenia już w większości zestarzałe (zielone). Samo to zakażenie było tym słabsze, im wyższe było stężenie N w piasku. W serii z 500 mg N na wazon brodawek nie było zupełnie. Rośliny tej serii (nie szczepione) odznaczały się specjalnie skróconym systemem korzeniowym.

Tabela VI

Wpływ wzrastających dawek KNO_3 i NH_4NO_3 na rozwój szczepionej i nieszczepionej lucerny

Влияние возрастающих доз KNO_3 и NH_4NO_3 на развитие инокулированной и неинокулированной люцерны

The influence of different amounts of KNO_3 and NH_4NO_3 upon the yield and nitrogen content of inoculated and uninoculated lucerne

L. p. serii	Ilość N na wazon mg	Rośliny szczepione		Rośliny nieszczepione		N w plonie pobrany z atmosfery **	
		A Nawożenie KNO_3 B					
		Sucha masa części nadziemnych roślin śr. z 1 wazonu					
		P l o n g	N w plonie mg	P l o n g	N w plon. mg	mg	%
1	10	8,17 ± 0,43	285	—	—	275	—
2	100	6,29 ± 0,35	211	3,00 ± 0,34	38	173	82
3	250	6,88 ± 0,13	231	4,87 ± 0,29	115	116	50
4	500	7,60 ± 0,42	263	3,46 ± 0,31	136	127	47
		A Nawożenie NH_4NO_3 B					
1	10	8,27±0,41	270	—	—	260	—
2	100	10,15±0,31	325	4,68±0,29	139***	186	57
3	250	10,00±0,35	326	5,95±0,26	153	173	53
4	500	10,55±0,39	328	6,28±0,51	208	120	39

** Ilość N obliczona z różnicy między plonem N roślin szczepionych i nieszczepionych.
*** Rośliny uległy słabemu zakażeniu.

W tabeli VI podajemy zestawienie plonów lucerny oraz zawartości w niej azotu. W tabeli tej widoczne jest, że najwięcej azotu z atmosfery przyswoiły te rośliny, które w piasku znalazły tylko minimalną dawkę mineralnego azotu. Zjawisko to stwierdzamy w serii nawożonej saletrą potasową i w serii z saletrą amonową. W seriach 3 i 4 (250 i 500 mg N) z saletrą potasową, a w seriach 2 i 3 (100 i 250 mg N) z saletrą amonową około połowa N znalezionego w lucernie szczepionej pochodziłaby z pożywki w piasku, połowa z atmosfery. W serii 4 (500 mg N) z azotanem amonu w przybliżeniu 64 % N pobrała roślina z piasku, a tylko 36 % z atmosfery.

Wskutek późnego zakażenia się roślin doświadczenie z lucerną straciło nieco na przejrzystości, ponieważ między pierwszym nieskutecznym a drugim już skutecznym szczepieniem rośliny niewątpliwie czerpały azot z piasku, przez co okres pobierania azotu z atmosfery został znacznie skrócony.

OMOWIENIE WYNIKÓW

Wyniki naszych badań nad azotowym odżywianiem się wyki i fasoli dowodzą, że pogląd, wyrażony na podstawie naszych pierwszych badań z tego zakresu, nie był mylny. Badania z fasolą wykazały, że wzrastające stężenie saletry potasowej w podłożu bynajmniej nie hamuje rozwoju samej rośliny, lecz hamuje jej zdolność przyswajania wolnego azotu.

Pod względem sposobu reagowania na wzrastające dawki saletry potasowej można fasolę przyrównać (spośród dotychczas badanych przez nas roślin) tylko do grochu (Nowotny-Mieczyńska i Ruszkowska 1952), który również dawał najwyższy plon przy najwyższej dawce mineralnego azotu z równoczesnym zahamowaniem funkcji wiązania wolnego azotu (Tabela I).

Inaczej rozwijała się w takich warunkach wyka. Rozwój tej rośliny był wyraźnie hamowany przez wysokie stężenie (500 mg N) saletry przy równoczesnym osłabieniu energii wiązania wolnego azotu przez system rośliny — bakterie. Pod względem reagowania na duże stężenie mineralnego azotu w podłożu należałoby wykę zaliczyć do grupy takich roślin motylkowych, jak soja, łubin (Nowotny-Mieczyńska i Ruszkowska 1952) i inne, które w tych warunkach nie tylko nie wiążą energicznie wolnego azotu, ale nadto słabo korzystają z azotu mineralnego (Tabela I).

Sposób reagowania na duże dawki mineralnego azotu w podłożu zależy jednak nie tylko od swoistych właściwości danej rośliny, ale także w dużym stopniu od aktywności szczepu *Rhizobium*, którym zakażano daną roślinę, a również od warunków zewnętrznych. Sądzimy, że jest to sprawa bardziej złożona niżby się wydawało. Na przykład w badaniach naszych z r. 1951 (Nowotny-Mieczyńska i Ruszkowska 1952) hamowanie rozwoju szczepionego żółtego łubinu przez dużą dawkę (500 mg N na 10 kg piasku) saletry potasowej było znacznie słabsze aniżeli w roku 1953 (tabela III), jakkolwiek warunki żywienia rośliny i technika prowadzenia tych doświadczeń były możliwie jednolite. Plon roślin w doświadczeniu 1951 r. i plon ich azotu były najwyższe w serii kontrolnej, tj. nie zasilonej nawet bodźczą dawką azotu (10 mg N na wazon), gdy tymczasem w doświadczeniach opisywanych w obecnej pracy *Rhizobium* działało najlepiej dopiero przy dawce 100 mg N na wazon.

Tematem niniejszych badań była również kwestia reakcji roślin na dwie różne formy mineralnego azotu: azotanowego i amonowego. Według wielu badaczy ujemny wpływ azotanu potasowego na rośliny motylkowe może polegać na fizjologicznie alkalicznym charakterze KNO_3. Aby tę sprawę wyświetlić, przeprowadzono porównawcze badania nad wpływem saletry potasowej i amonowej na rozwój łubinu i lucerny (tabele III, VI). Stwierdzono istotnie lepsze działanie saletry amonowej niż potasowej (z grochem przeprowadzono analogiczne doświadczenie w r. 1950 i stwierdzono, że forma azotu mineralnego była dla tej rośliny obojętna (Nowotny-Mieczyńska i Ruszkowska 1952). Ścisła kontrola zmian w odczynie

piasku, na którym uprawiano łubin i lucernę, wykazała słabe alkalizowanie podłoża pod wpływem saletry potasowej. Zmiany zachodzące w odczynie podłoża w trakcie rozwoju roślin były jednak zbyt słabe, aby same mogły być przyczyną różnic w rozwoju badanych roślin. W hodowli żółtego łubinu stwierdziliśmy pod koniec wegetacji w seriach nawożonych KNO_3 pH = 7,1, czyli istotnie nieco za wysokie dla tej rośliny, ale nie może to tłumaczyć aż tak słabego rozwoju roślin. Wydaje się, że korzystniejsze działanie saletry amonowej niż saletry potasowej należy przypisać przede wszystkim łatwiejszej przyswajalności azotu z soli amonowych niż z azotanów. Na przykładzie łubinu (tabela III) widzieliśmy, że przy dużym stężeniu KNO_3 w podłożu roślina pobrała bardzo mało azotu mineralnego i bardzo mało atmosferycznego, natomiast przy takim samym stężeniu saletry amonowej roślina korzystała w wyższej mierze z obu tych źródeł azotu. Lucerna przyswoiła we wszystkich seriach z saletrą amonową o około 100 mg N więcej na wazon niż z saletry potasowej (tabela VI).

Korzystniejsze działanie soli amonowych niż azotanowych rzuca nieco światła na mechanizm wiązania wolnego azotu przez system symbiotyczny.

Większość badaczy przychyla się raczej do amoniakalnej teorii wiązania wolnego azotu, a to na tej podstawie, że wolno żyjące organizmy, uzdolnione do korzystania z cząsteczkowego azotu, mając do wyboru azot amoniakalny i azot azotanowy natychmiast i w całości pobierają ten pierwszy, gdy tymczasem pobieranie azotu z azotanów wymaga dopiero pewnego krótszego czy dłuższego czasu adaptacji. Burris, Orcutt i Umbreit (1952) stwierdzili, że nacechowany azot (N_2^{15}), pobrany przez rośliny motylkowe, zostaje odłożony głównie w kwasie glutaminowym i we frakcji amoniakalnej. Dowodów takich nagromadziła już nauka sporo, a wyniki naszych badań byłyby też w pewnym stopniu argumentem przemawiającym za amoniakalną teorią wiązania wolnego azotu.

W doświadczeniu nad wpływem przedplonu łubinowego na owies stwierdziliśmy, że w seriach z najwyższą dawką saletry potasowej (500 mg N) łubin pozostawił większość saletry w podłożu, z czego skorzystał uprawiany po łubinie owies, dając dość wysoki plon, dużo większy niż w analogicznej serii z azotanem amonu (tabela II). Trudno jest jednak na podstawie wyników jednego doświadczenia orzec, z jakiego źródła korzystał łubin energiczniej, mając w podłożu różne (niższe niż 500 mg N) dawki saletry potasowej czy amonowej. Na to pytanie daje nam wyraźniejszą odpowiedź doświadczenie z lucerną: przy małej dawce KNO_3 (100 mg N) lucerna pobrała większość N z atmosfery, natomiast w seriach z wyższymi dawkami (250 i 500 mg N na wazon) mniej więcej połowę azotu pobrała z podłoża, a połowę z powietrza. W seriach z najwyższym stężeniem N azotanu amonowego w podłożu pobieranie azotu z tego właśnie źródła było energiczniejsze niż wiązanie azotu z powietrza (tabela VI).

STRESZCZENIE WYNIKÓW

1) Fasola pobiera azot azotanowy nawet wtedy, gdy jego stężenie w podłożu jest dość wysokie. Energia wiązania wolnego azotu maleje wraz ze wzrostem stężenia mineralnego azotu w pożywce (Tabela I).

2) Wyka rozwija się najlepiej przy miernym stężeniu azotu w podłożu (100—250 mg N na wazon). Przy dużym stężeniu azotu mineralnego

energia wiązania wolnego azotu słabnie; równocześnie rozwój roślin, zwłaszcza produkcja ziarna, ulega zahamowaniu (Tabela I).

3) Azotan amonu jest dla łubinu i lucerny łatwiej przyswajalnym związkiem azotu aniżeli saletra potasowa (Tabela III i VI).

4) Przy najwyższym stężeniu KNO_3 w podłożu rozwój owsa uprawianego po łubinie był znacznie lepszy aniżeli w analogicznej serii z azotanem amonu (Tabela IV).

5) Lucerna w przybliżeniu połowę azotu pobiera za pośrednictwem bakterii symbiotycznych, a połowę z pożywki mineralnej. Wykorzystanie saletry amonowej było lepsze niż saletry potasowej (Tabela VI).

А. Новотны-Мечинска и М. Рушковска

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА НА РАЗВИТИЕ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ ЧАСТЬ II.

Резюме

Авторами были проведены опыты, целью которых было установление урожая бобовых растений в сосудах с песком на полном удобрении при постепенном увеличивании доз KNO_3 и NH_4NO_3.

Эти опыты дали следующие результаты:

Фасоль хорошо развивалась даже при большой концентрации калийной селитры (500 мг N в 10 кг песку), причем одновременно прекращались процессы фиксации молекулярного азота (табл. I). Вика при больших концентрациях KNO_3 развивалась слабо, давая очень малый сбор зерен; фиксация молекулярного азота в этом случае подвергалась полному прекращению (табл. I).

Целью опытов с желтым люпином и люцерной было сравнение влияния KNO_3 и NH_4NO_3 на развитие растений и образование корневых клубеньков. Найдено, что азот амиячной селитры легче усваивается этими растениями, чем азот калийной селитры. Процессы фиксации молекулярного азота протекают энергичнее при удобрении амиячной селитрой (малые дозы), чем при удобрении калийной селитрой (табл. III, VI).

Кроме того были произведены два опыта, на основании которых выявилось какое количество азота усваивалось инокулированными растениями при помощи клубеньков из атмосферы и какое количество они усвоили из песка, удобренного возрастающими дозами минерального азота.

1. В опытах с люпином исследовано влияние этого растения на развитие овса, посеянного после люпина и найдено, что овес усвоил больше минерального азота, чем люпин. Это обозначает, что люпин большую часть минерального азота оставил в субстрате (табл. IV).

2. В опытах с инокулированной и неинокулированной люцерной оказалось, что эти растения половину азота усвоили из атмосферы при помощи клубеньков (азот молекулярный), а вторую половину из субстрата (азот минеральный) (табл. VI).

A. Nowotny-Mieczyńska and *M. Ruszkowska*

THE INFLUENCE OF MINERAL NITROGEN UPON THE GROWTH OF LEGUMINOUS PLANTS. PART II.

Summary

In order to investigate the influence of different amounts and different forms of combined nitrogen (KNO_3 and NH_4NO_3) upon the growth of some leguminous plants, a set of pot experiments has been performed. Attempt has been made to determine, how much nitrogen is taken up from the soil, and how much is fixed by the roots of inoculated lupine and lucerne, grown in sand supplied with different amounts of combined nitrogen.

1) It was established, that the growth of inoculated beans occurs very well in the presence of an excess of KNO_3 (500 mg N per 10 kg sand), but the nitrogen fixation was at the same time wholly inhibited. In the case of vetch (*Vicia faba*) a high amount of KNO_3 in the culture medium inhibited the growth of the plants, their seed production, and nitrogen fixation power (Table I).

2) The effect of KNO_3 and NH_4NO_3 upon the growth and nodulation of inoculated yellow lupine and lucerne has been compared. It was ascertained, that NH_4NO_3 is a much more readily available source of nitrogen, than KNO_3 (Table III, VI).

3) A crop of oats was grown after the harvest of lupine in order to determine the nitrogen „after-effect" of lupine. It was established, that oats took up from the soil (at the highest level of KNO_3) much more nitrogen than did the lupine (Table IV).

4) It was showed, that inoculated lucerne obtained about 50% of their nitrogen from the soil, and 50% via the root nodules (Table VI).

LITERATURA

1. Burris R. H., Orcutt F. S. a. Umbreit W. W., 1952: wg P. W. Wilson, 1952, *Advances in Enzymology*, **13**.
2. Nicol H., 1934: The derivation of nitrogen of crop plants with special reference to associated growth, *Biol. Rev.*, **9**.
3. Nowotny-Mieczyńska A. i Ruszkowska M., 1952: Wpływ azotu mineralnego na rozwój szczepionych roślin motylkowych, *Acta Microbiol. Polon.*, 1.
4. Nowotny-Mieczyńska A. 1952: *Rocz. Nauk Rol. i Leś.* 65.
5. Thornton H. G., wg Nicol H., 1936: The utilisation of atmospheric nitrogen by mixed crops. *Monthly Bull. Agr. Sci.* a. *Pract.*, **6** : 7.
6. Virtanen A. I., von Hausen G. u. Karström H., 1933: Die Ausnutzung des aus den Wurzelknöllchen herausdiffund. Stickstoff durch Nichtleguminose, *Biochem. Zeitschr.*, **258** : 106.

T. Bukowski

WPŁYW DWUCHLORKU ETYLENU $C_2H_4Cl_2$ NA PRZYŚPIESZENIE KIEŁKOWANIA ZARODNIKÓW PIECZARKI

Komunikat z Laboratorium Mykologicznego Wytwórni Grzybni Pieczarek w Warszawie

Wpłynęło dnia 3.IV.1954 r.

Zarodniki pieczarki, *Agaricus hortensis* Cooke, zanim zaczną kiełkować, znajdują się w stanie spoczynku stosunkowo dość długo. Okres spoczynkowy od momentu wysiania na pożywkę do momentu kiełkowania trwa około 3 tygodni. Pierwsze próby skrócenia tego dość długiego okresu spoczynkowego podjęła Ferguson (1902), która zaobserwowała szybszy rozwój zarodników pod wpływem innych kiełkujących zarodników lub strzępków grzybni, wprowadzonych do kultury. Falck (1924) potwierdził obserwacje Ferguson. Wykonał on wiele doświadczeń używając różnych pożywek. Falck wysunął hipotezę, że owymi specyficznymi bodźcami, ułatwiającymi kiełkowanie, są kwasy organiczne produkowane przez inne grzyby, które normalnie poprzedzają pojawienie się pieczarki. Po dodaniu 0,25% kwasu bursztynowego do brzeczki zaobserwował on kiełkowanie zarodników już po 9 dniach. Bechman (1930) usiłował przyśpieszyć proces kiełkowania za pomocą różnego rodzaju preparatów enzymatycznych, jednak próby te się nie powiodły. Kehl (1942) użył chloroformu i tetrachloru uzyskując kiełkowanie po 9 dniach.

W celu przyśpieszenia kiełkowania zarodników pieczarki autor niniejszej pracy użył dwuchlorku etylenu $C_2H_4Cl_2$, który jest znanym obok chloroformu środkiem do narkotyzowania nasion.

Do badań wybrano zarodniki *Agaricus hortensis* Cooke z kolekcji Laboratorium Wytwórni Grzybni Pieczarek, używając w tym celu 3 rodzajów podłoży:

1) pożywka na 1,5% agarze z brzeczką,

2) pożywka na 1,5% agarze z roztworem Knoppa,

3) pożywka na 1,5% agarze z dodatkiem glukozy i fruktozy. Wyjałowione pożywki szczepiono zarodnikami pieczarki, które przedtem poddano działaniu narkotyku przez okres od 5 minut do 1 tygodnia. Hodowle prowadzono w temperaturze 24° w ciągu 4 tygodni. Badano wzrost i stopień zakażenia bakteryjnego.

WYNIKI BADAŃ

Stwierdzono, że w pożywce na 1,5% agarze z brzeczką już po 8 dniach następuje kiełkowanie zarodników. Po pięciominutowym działaniu dwuchlorku etylenu bakterie przerastały jedynie 5% kultur grzyba. Po 3 godzinach działania narkotyku nie stwierdzono wcale zakażenia bakteryjnego (Tab. I).

Na agarze z roztworem Knoppa oraz na agarze z glukozą i fruktozą kiełkowanie zarodników nastąpiło po 18–24 dniach. Na kontrolnych

pożywkach z brzeczką kiełkowanie zarodników nie narkotyzowanych dwuchlorkiem etylenu nastąpiło po 14—21 dniach.

Tabela I

Wpływ $C_2H_4Cl_2$ na czas kiełkowania i na stopień zakażenia bakteriami czystych kultur zarodników pieczarki

Влияние $C_2H_4Cl_2$ на время прорастания и на степень заражения бактериями чистых культур спор шампиньонов

The influence of $C_2H_4Cl_2$ on the germination of the spores of *Agaricus hortensis* Cooke

Czas działania narkotyku	Stopień zakażenia bakteriami	Ilość zarodników kiełkujących w %	Szybkość kiełkowania w dniach
5 minut	5%	80	8
30 „	2	70	9
1-2 godzin	1	100	9
3 „	0	100	8—10
24 „	0	60	10
48 „	0	60	11—20
1 tydzień	0	0	0

Na podstawie powyższych wyników należy przypuszczać, że dwuchlorek etylenu, podobnie jak chloroform, działa stymulująco na kiełkowanie zarodników pieczarki oraz że zapobiega zakażeniu bakteryjnemu.

T. Буковски

ВЛИЯНИЕ ДВУХЛОРИСТОГО ЭТИЛЕНА ($C_2H_4Cl_2$) НА УСКОРЕНИЕ ПРОРАСТАНИЯ СПОР ШАМПИНЬОНОВ

Резюме

Автором установлено, что двухлористый этилен стимулирует прорастание спор *Agaricus hortensis* Cooke. При пятиминутном действии паров $C_2H_4Cl_2$ на споры прорастание началось уже спустя 8 дней.

Действие двухлористого этилена через 3 часа предохраняло культуру перед заражением бактериями.

T. Bukowski

THE INFLUENCE OF ETHYLENE-BICHLORIDE, $C_2H_4Cl_2$, ON THE GERMINATION OF THE SPORES OF *AGARICUS HORTENSIS* COOKE

Summary

The author states that ethylene-bichloride has a stimulating effect on the germination of the spores of *Agaricus hortensis* Cooke. After 5 minutes exposure to the vapours of $C_2H_4Cl_2$, germination followed in about 8 days. A bactericidal effect has been reached after 3 hours of exposure.

LITERATURA

1. Bechman E., 1930: Über die Sporenkeimung des Champignons, *Zeitsch. f. Botan.*, 22 : 289.
2. Falck R., 1924: Über die Sporenkeimung des Champignons, *Mykol. Untersuchungen u. Berichte*, Beiheft I.
3. Ferguson M. C., 1902: A preliminary study of the germination of the spores of *Agaricus campestris* and other Basidiomycetous fungi, *Bull. U. S. Bur. Plant. Ind.*, No 85.
4. Kehl H., 1942: Zur Keimungsphysiologie der Champignonsporen, *Gartenbauwissenschaft*, 17 : 156.

T. Bukowski

TECHNIKA ZBIORU ZARODNIKÓW GRZYBÓW KAPELUSZOWYCH PRZEZNACZONYCH DO KIEŁKOWANIA

Z Laboratorium Mykologicznego Wytwórni Grzybni Pieczarek w Warszawie
Wpłynęło dnia 3.II.1954 r.

WSTĘP

Sposób zbierania zarodników ma zasadnicze, ale mało doceniane znaczenie, jeśli chodzi o jego wpływ na procent kiełkowania. Istnieje kilka sposobów zbierania zarodników. Styer (1930) dezynfekuje dojrzały owocnik z nie uszkodzoną osłoną częściową w alkoholu, po czym łamie go na kawałki, które umieszcza w płytkach Petriego. W podobny sposób postępuje Cayley (1936). Glasscock (1946) zanurza na chwilę dojrzały, nie uszkodzony owocnik do spirytusu metylowego, opala go, po czym umieszcza owocnik na drucie w sterylnym słoju, zatkanym korkiem z waty. Każda z tych metod polega na zachowaniu ścisłej sterylności od momentu zbioru owocnika, do momentu wysiania zarodnika. Metody powyższe mają tę wspólną cechę, że odrywają owocnik od naturalnego podłoża, co w konsekwencji powoduje zahamowanie procesu rozwoju podstawek i zmniejszenie procentu dojrzałych, zdolnych do kiełkowania zarodników.

BADANIA WŁASNE

Przy zbiorze zarodników *Agaricus hortensis* Cooke autor niniejszej pracy odrzucił metodę wyrywania owocnika z jego podłoża i zbierał zarodniki bezpośrednio z rosnącej pieczarki. W tym celu wycięto krążek bibuły filtracyjnej o średnicy około 15 cm z wykrojonym w środku otworem o średnicy 3 cm, który przedarto od obwodu do środka i po wysterylizowaniu nałożono tuż pod blaszkami rozpostartego owocnika, rosnącego na grzędzie pieczarkowej. Brzeg bibuły przymocowano do kapelusza szpilkami. Gdy krążek bibuły pokrył się delikatną warstwą zarodników, przenoszono go do szczelnego dzwonu, w którym znajdował się tampon nasączony dwuchlorkiem etylenu, $C_2H_4Cl_2$, zapobiegającego rozwojowi bakterii i przyśpieszającego kiełkowanie zarodników pieczarki (Bukowski 1954).

Dobre wyniki uzyskano również w ten sposób, że dojrzałą pieczarkę z nie uszkodzoną osłoną częściową wyjmowano z grzędy i wraz z ziemią i przylegającymi strzępkami zanurzano na chwilę do 2% roztworu H_2O_2, po czym stawiano do małej zlewki, dopełniając ją w miarę potrzeby wodą. Jak poprzednio, tuż pod kapeluszem nakładano krążek sterylnej bibuły lub celofanu, na który opadały dojrzałe zarodniki. Zbiór zarodników przeprowadzano w tym wypadku w szafce Hansena.

WYNIKI

Procent udanych kultur przy użyciu dawniejszych metod wynosił przeciętnie 70%, przy zbieraniu zaś zarodników z owocników rosnących na grzędzie otrzymywano 100% udanych kultur. Opierając się na obserwacji Bullera (1924), że cykl rozwojowy podstawki do momentu całkowitego dojrzenia zarodnika trwa 8 godzin, w przeciągu tego okresu co godzinę zbierano zarodniki i wysiewano je na skośny agar z brzeczką.

Zbieranie zarodników z rozpostartego kapelusza rozpoczynano w 4 godziny po wyjęciu go z grzędy.

Tabela I

Zależność zdolności kiełkowania od czasu zbioru zarodników

Зависимость способности к прорастанию спор от времени их сбора

The effect of the time of spore collection on the spore-germination

Godziny zbioru zarodników	% kiełkujących zarodników	
	po 9 dniach	po 20 dniach
Pierwsza godzina	25	50
Druga „	25	25
Trzecia „	12	12
Czwarta „	38	75
Piąta „	40	80
Szósta „	80	100
Siódma „	70	100
Ósma „	80	100

DYSKUSJA

Dla zrozumienia procesu dojrzewania zarodników należy zaznaczyć, że nie wszystkie podstawki wykształcają się od razu, ale że narastają one stopniowo. Gdy pierwszy komplet podstawek zrzuca zarodniki, następny komplet stopniowo wykształca się, a następnie zrzuca dojrzałe zarodniki (Langeron 1945). Proces narastania podstawek i zrzucania dojrzałych zarodników trwa nieprzerwanie przez 4—6 dni, póki nie wykształcą się wszystkie podstawki. Zarodnik nie jest oddzielony błoną od sterygmy (Lohwag 1941), a więc wszelkie procesy życiowe, odbywające się w podstawkach, wywierają wpływ na dojrzewające na sterygmach zarodniki. Dla normalnego przebiegu procesu wzrostu rośliny konieczne jest nasycenie protoplazmy wodą.

Oderwanie owocnika od podłoża wstrzymuje dopływ wody i zmienia bieg procesów zachodzących w komórkach owocnika. Zarodniki, które znajdowały się na podstawkach w momencie zerwania owocnika w stanie dojrzałym lub dojrzewania, opadają. Na podstawkach wykształcają się i dalsze jeszcze zarodniki, ale na skutek zmienionych warunków środowiska nie wszystkie dochodzą do pełnej dojrzałości. Tym się tłumaczy znaczny pro-

cent nie kiełkujących zarodników i nie udanych kultur, jeśli zbiera się zarodniki starymi metodami. Tablica pierwsza ilustruje słuszność wyżej cytowanych wywodów.

W pierwszych godzinach zbierania zarodników kiełkowało na 20 dzień 25% do 50% wysianych kultur. W trzeciej godzinie tylko 12 %. W następnych godzinach owocnik jak gdyby stopniowo przyzwyczaił się do nowych warunków i procent udanych kultur wzrósł.

W szystej i następnych godzinach doszło do normalnego nasycenia protoplazmy komórek owocnika wodą i zanotowano 100 % udanych kultur.

Należy zatem zmodyfikować sposób zbierania zarodników grzybów kapeluszowych do celów kiełkowania, a mianowicie zbierać je starając się jak najdłużej zachować naturalne warunki rozwoju owocnika.

T. Буковски

ТЕХНИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ СБОРА СПОР ШЛЯПОЧНЫХ ГРИБОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ К ПРОРАСТАНИЮ

Резюме

Споры собирались на поднос, помещенный под шляпой гриба растущего на своем природном субстрате, или же после перемещения гриба вместе с прилегающей к нему землей в стерильной сосуд, содержащий воду.

В таких условиях базидия развивались дальше и получалось 100%-ое прорастание собранных спор.

T. Bukowski

SPORE-COLLECTION FROM MUSHROOMS FOR GERMINATION PURPOSES

Summary

The spore-collection has been carried out on mushrooms growing on mushroom-beds or on sporophores taken out from beds with adhering spawn and earth. The base of the stipe has been put in a small tube containing water. Under these conditions the cap continues to develop fairly normally and the shed spores are mature and germinate in 100 p. c.

LITERATURA

1. Bukowski T., 1954: Wpływ dwuchlorku etylenu $C_2H_4Cl_2$ na przyśpieszenie kiełkowania zarodników pieczarki. *Acta Microbiol. Polon.*, **3** : 395.
2. Buller R., 1924: Researches on Fungi. Vol. 3, London, Longmans.
3. Cayley D., 1936: Spores and spore germination in wild and cultivated mushrooms, *Transact. Brit. Mycol. Soc.*, **120** : 225.
4. Glasscock H. H., 1946: Pure culture mushroom spawn, *Jour. Min. Agric.*, **53** : 353.
5. Langeron M., 1945: Precis de Mycologie, Paris, Masson et Cie.
6. Lotwag H., 1941: Handbuch der Pflanzenanatomie, Band VI. Berlin, Borntraeger.
7. Maksimow M., 1950: Fizjologia roślin, Warszawa, PWRiL.
8. Styer J. F., 1930: Nutrition of the cultivated mushroom. *Amer. Journ. Bot.*, **17** : 982.

SPIS TREŚCI

str.

W. Ostrowski, B. Skarżyński i T. W. Szczepkowski: Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. Część II. Witaminy grupy B u *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans* 351

R. Pakula, M. Tyc i Wł. Walczak: Bakteriolizyny promieniowców. I. Otrzymywanie bakteriolizyn, zasięg oraz warunki działania 363

R. Pakula, M. Tyc i Wł. Walczak: Bakteriolizyny promieniowców. II. O niektórych właściwościach czynnika litycznego 373

A. Nowotny-Mieczyńska i M. Ruszkowska: Wpływ mineralnego azotu na rozwój roślin motylkowych. Część II 381

T. Bukowski: Wpływ dwuchlorku etylenu $C_2H_4Cl_2$ na przyśpieszenie kiełkowania zarodników pieczarki 395

T. Bukowski: Technika zbioru zarodników grzybów kapeluszowych przeznaczonych do kiełkowania 399

Содержание

стр

В. Островски, Б. Скаржински и Т. В. Щепковски: Биохимия автотрофных серобактерий. Часть II. Витамины группы „В" у *Thiobacillus thioparus* и *Thiobacillus tchiooxydans* 351

Р. Пакула, М. Тыц, В. Вальчак: Бактериолизины актиномицетов. I. Получание бактериолизинов, предел и условия их действия 363

Р. Пакула, М. Тыц, В. Вальчак: Бактериолизины актиномицетов. II. О некоторых свойствах литического фактора 373

А. Новотны-Мечинска и М. Рушковска. Влияние минерального азота на развитие бобовых растений. Часть II . . . 381

Т. Буковски: Влияние дихлористого этилена $C_2H_4Cl_2$ на ускорение прорастания спор шампиньонов 394

Т. Буковски: Технические способы сбора спор шляпочных грибов, предназначенных к прорастанию 399

CONTENTS

page

W. Ostrowski, B. Skarżyński and T. W. Szczepkowski: The biochemistry of autotrophic sulphur bacteria Part. II. The biocatalysers from the Vitamin-B group in *Th. thioparus* and *Th. thiooxydans* 351

R. Pakuła, M. Tyc and Wł. Walczak: The bacteriolytic activity of *Streptomyces*. I. Production of bacteriolysin and conditions of its activity . 363

R. Pakuła, M. Tyc and Wł. Walczak: The bacteriolytic activity of *Streptomyces*. II. Some properties of the lytic factor 373

A. Nowotny-Mieczyńska and M. Ruszkowska: The influence of mineral nitrogen upon the growth of leguminous plants, Part. II. . . . 381

T. Bukowski: The influence of ethylene- bichloride. $C_2H_4Cl_2$, on the germination of the spores of *Agaricus hortensis* Cooke 395

T. Bukowski: Spore- collection from mushrooms for germination purposes . 399

SKOROWIDZ AUTORÓW

str.

Baranowska J.: patrz Shugar D. 11
Błaszczak Wł.: Badania nad skutecznością działania środków dezynfekcyjnych (formalina, sublimat) na żywotność sklerot *Rhizoctonia solani* . . . 29
Brzezińska-Dudziak B. Oznaczanie ilości ameb w glebie wg zmodyfikowanej metody Singha 121
Bukowski T.: Wpływ dwuchlorku etylenu, $C_2H_4Cl_2$, na przyśpieszenie kiełkowania zarodników pieczarki 395
Bukowski T.: Technika zbioru zarodników grzybów kapeluszowych przeznaczonych do kiełkowania 399
Doleżko H.: patrz Kunicki-Goldfinger Wł. i współpracownicy 93
Dygdała K.: patrz Kunicki-Goldfinger Wł. i współpracownicy 93
Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St. i Zodrow K.: Wytwarzanie witaminy B_{12} przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces* . . . 3
Kunicki-Goldfinger Wł., Dygdała K., Tuszyńska B. i Doleżko H.: Dyfteroidy glebowe cz. III. Własności fizjologiczne i klasyfikacja 93
Kunicki-Goldfinger Wł.: Zmienność bakterii 199
Mierzejewski T.: Badania nad składem węglowodanowym ektoplazmy *Corynebacterium equi* 21
Nowotny-Mieczyńska A. i Ruszkowska M.: Wpływ mineralnego azotu na rozwój roślin motylkowych. Część II 381
Ostrowski Wł.: Zastosowanie metod mikrobiologicznych do analizy biochemicznej 35
Ostrowski Wł., Skarżyński B. i Szczepkowski T. W.: Biochemia samożywnych bakterii siarkowych; część II. Witaminy grupy B w *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans* 351
Pakuła R., Tyc M. i Walczak Wł.: Bakteriolizyny promieniowców; I. Otrzymywanie bakteriolizyn, zasięg oraz warunki działania . . . 363
Pakuła R., Tyc M. i Walczak Wł.: Bakteriolizyny promieniowców; II. O niektórych właściwościach czynnika litycznego 373
Pawełkiewicz J.: patrz Janicki J. i współpracownicy . . . 3
Ruszkowska M.: patrz Nowotny-Mieczyńska A. . . . 381
Shugar D. i Baranowska J.: Badania nad mechanizmem barwienia metodą Grama. Rola białek 11
Shugar D.: Lizozym 125
Skarżyński B.: patrz Ostrowski W. i współpracownicy . . . 351
Stawicki St.: patrz Janicki J. i współpracownicy 3
Strzemska J.: Bibliografia polskiej mikrobiologii glebowej, lata 1945—1952 63
Strzemska J.: Bibliografia prac z zakresu mikoryzy, lata 1758 — 1953 . . 155
Szczepkowski W. T.: patrz Ostrowski W. i współpracownicy . 351
Szember A.: Zarys rozwoju badań mikrobiologicznych nad kiszonkami paszowymi 47
Tuszyńska B.: patrz Kunicki-Goldfinger Wł. i współpracownicy 93
Tyc M.: patrz Pakuła R. i współpracownicy 363
Tyc M.: patrz Pakuła R. i współpracownicy 373
Walczak Wł.: patrz Pakuła i współpracownicy 363
Walczak Wł.: patrz Pakuła i współpracownicy 373
Wiercieńska D.: Oznaczanie penicyliny w płynach ustrojowych za pomocą próby reduktazowej 113
Zodrow K.: patrz Janicki J. i współpracownicy 3

SKOROWIDZ RZECZOWY

str.

Ameby, oznaczanie ilości w glebie (B. Brzezińska-Dudziak) . 121
Azot mineralny — patrz Rośliny motylkowe
Bakterie — patrz Zmienność
„ — siarkowe, witaminy grupy B (W. Ostrowski i współpracownicy) 351
Bakteriolizyny promieniowców, patrz Promieniowce
„ „ własności czynnika litycznego — patrz Promieniowce
Bibliografia — mikoryza — patrz Mikoryza
„ — mikrobiologii glebowej — patrz Mikrobiologia glebowa
Corynebacterium equi, skład węglowodanowy ektoplazmy (T. Mierzejewski) 21
Dezynfekcyjne środki działanie na *Rhizoctonia solani* — patrz *Rhizoctonia solani*
Dwuchlorek etylenu, wpływ na kiełkowanie zarodników pieczarki (T. Bukowski) 395
Dyfteroidy glebowe, własności fizjologiczne (Wł. Kunicki-Goldfinger i współpracownicy) 93
Gleba, oznaczanie ilości ameb — patrz Ameby
Gram, metoda barwienia, rola białek (D. Shugar i J. Baranowska) 11
Grzyby, technika zbioru zarodników (T. Bukowski) 399
Kiszonki, rozwój badań mikrobiologicznych (A. Szember) 47
Lizozym (D. Shugar) 125
Mikoryza, bibliografia (J. Strzemska) 155
Mikrobiologia glebowa, bibliografia (J. Strzemska) 63
Penicylina, oznaczenie przy pomocy próby redukcyjnej (D. Wierciańska) . 113
Pieczarki, wpływ dwuchlorku etylenu — patrz Dwuchlorek
Promieniowce, wytwarzanie witaminy B_{12} — patrz Witaminy
„ — bakteriolizyny, otrzymywanie (R. Pakuła i współpracownicy) 363
„ — bakteriolizyny, własności czynnika litycznego (R. Pakuła i współpracownicy) 373
Redukcyjna próba — patrz Penicylina
Rhizoctonia solani, działanie środków dezynfekcyjnych (Wł. Błaszczak) . . 29
Rośliny motylkowe, wpływ mineralnego azotu (A. Nowotny-Mieczyńska i M. Ruszkowska) 381
Streptomyces, wytwarzanie witaminy B_{12} — patrz Witaminy
Thiobacillus thioparus i *Thiobacillus thiooxydans* — patrz Bakterie siarkowe
Witaminy — oznaczanie metodą mikrobiologiczną (Wł. Ostrowski) . . 35
„ — grupy B — patrz Bakterie siarkowe
„ — wytwarzanie witaminy B_{12} przez promieniowce (J. Janicki i współpracownicy) 3
Zmienność bakterii (Wł. Kunicki-Goldfinger) 199

Cena zł 10.—

WYKAZ
PRENUMERATY PONIŻSZYCH CZASOPISM NAUKOWYCH
NA ROK 1955

Jak najwcześniejsze zamówienie prenumeraty na rok 1955 zapewni nieprzerwaną, regularną dostawę czasopisma i pomoże w prawidłowym ustaleniu ich nakładów.

Tytuł	Ilość nr w roku	Prenumerata roczna	Tytuł	Ilość nr w roku	Prenumerata roczna
Acta Geophysica Polonica	4	48	Folia Biologica	4	48
Acta Geologica Polonica	4	80	Kosmos	6	48
Acta Biochimica Polonica	4	60	Postępy Fizyki	4	40
Acta Microbiologica Pol.	4	40	Postępy Hig. i Med. Dośw.	4	48
Acta Physica Polonica	4	48	Roczniki Chemii	4	80
Biuletyn PAN Wydz. II			Sprawozdanie z czynności		
jęz. ros.	4	20	i prac PAN	4	40
jęz. ang.	4	20	Wiadomości Chemiczne	12	48
Chrońmy Przyrodę Ojczystą	4	24	Wszechświat	10	48
Ekologia Polska	4	28			

Wpłaty na prenumeratę należy przekazywać na konto P. K. O. Nr 1-110-14000, Centralna Ekspedycja P. P. K. „Ruch" Warszawa, ul. Srebrna 12, podając na blankiecie tytuł zamawianego czasopisma.

Instytucje i biblioteki zamawiające różne czasopisma naukowe winny równocześnie z przekazem P. K. O. podać na powyższy adres tytuły zamawianych czasopism, ilość egzemplarzy każdego tytułu oraz czasokres prenumeraty.

W Warszawie oraz miastach wojewódzkich przyjmuje „Ruch" zamówienia zbiorowe na czasopisma z dostawą bezpośrednią. Instytucje i biblioteki mogą kierować zamówienia: w Warszawie — do Delegatury „Ruchu", ul. Rutkowskiego 25 tel. 696-96, w miastach wojewódzkich — do miejscowych oddziałów wojewódzkich „Ruchu".